

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE FILOSOFÍA, LETRAS Y CIENCIAS DE LA EDUCACIÓN
INSTITUTO SUPERIOR DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO ISIF
CARRERA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**REPETICIONES POLIMÓRFICAS CAG Y GGC DEL GEN RECEPTOR DE
ANDRÓGENOS COMO FACTORES DE RIESGO ASOCIADAS AL CÁNCER
PROSTÁTICO EN DETERMINADOS GRUPOS POBLACIONALES DEL ECUADOR
2004-2010**

**Proyecto de Áreas de formación profesional, presentado como requisito parcial para optar por
el Grado de Licenciatura en Ciencias Biológicas y Ambientales**

Autor: Paulo César Robles Ruíz

C.I: 040123378-8

Tutor: Dr. Iván Morillo

Quito, septiembre, 2012

A Gladys y a Nelly

RECONOCIMIENTO

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de las Américas, institución que financió y aportó con las instalaciones necesarias para la realización de este trabajo, gracias al respaldo del Dr., César Paz-y-Miño.

A los centros de patología de Hospital Carlos Andrade Marín, SOLCA-Quito e IESS Loja, por permitirme acceder a las muestras de piezas tumorales prostáticas y por su orientación en el área epidemiológica y oncológica.

Un agradecimiento especial a Tania, Meli, Majo, Mariu por sus enseñanzas y orientación para la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, por sus consejos y aporte con reactivos o muestras.

A cada uno de los voluntarios provenientes de todas las regiones del país, que participaron como población control y población indígena,

AUTORIZACIÓN DE LA AUTORIA INTELECTUAL

Yo, Paulo César Robles Ruiz, en calidad de autor del trabajo de investigación o tesis realizada sobre el tema: **REPETICIONES POLIMÓRFICAS CAG Y GGC DEL GEN RECEPTOR DE ANDRÓGENOS COMO FACTORES DE RIESGO ASOCIADAS AL CÁNCER PROSTÁTICO EN DETERMINADOS GRUPOS POBLACIONALES DEL ECUADOR 2004-2010**, por la presente autorizo a la **UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR**, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o de parte de los que contiene esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autor me corresponden, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8; 19 y demás pertinentes de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Quito, septiembre del 2012

.....
C.C: 040123378-8

APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi calidad de Tutor del Proyecto de ÁREAS DE FORMACIÓN PROFESIONAL presentado por PAULO CÉSAR ROBLES RUÍZ para optar por el Grado de Licenciatura en CIENCIAS BIOLÓGICAS; cuyo título es: **REPETICIONES POLIMÓRFICAS CAG Y GGC DEL GEN RECEPTOR DE ANDRÓGENOS COMO FACTORES DE RIESGO ASOCIADAS AL CÁNCER PROSTÁTICO EN DETERMINADOS GRUPOS POBLACIONALES DEL ECUADOR**, considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del tribunal examinador que se designe.

En la ciudad de Quito, a los 11 días del mes de septiembre del 2007.

Dr. Iván Morillo Villareal
C.C.: IVAN MORILLO VILLAREAL
1707615256

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RECONOCIMIENTO	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vi
INDICE DE ANEXOS.....	x
INDICE DE TABLAS	xi
INDICE DE GRÁFICOS	xii
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO I	2
EL PROBLEMA	2
Planteamiento del Problema	2
Formulación del problema.....	3
Preguntas directrices	4
Objetivos	5
Justificación	6
Limitaciones.....	6
CAPITULO II	7
MARCO TEORICO	7
Antecedentes del problema.....	7
Fundamentación Teórica	10
Cáncer de Próstata.....	10
Bases Genéticas del Cáncer.-.....	11
Epidemiología del Cáncer de Próstata.-.....	12
Etiología del Cáncer de Próstata.....	13
<i>Edad.-</i>	14
<i>Grupo étnico.-</i>	14
<i>Antecedentes Familiares.-</i>	14
<i>Dieta.-</i>	15
<i>Otros factores de riesgo.-</i>	15
Función de los Andrógeno y actividad metabólica.-.....	16
Receptor nuclear androgénico y metabolismo prostático.-	17

Gen Receptor de andrógenos (AR) en la patología prostática.-	18
Repeticiones polimórficas CAG y GGC del Receptor de Andrógenos (AR CAG-GGC).-.....	19
Mutaciones dinámicas.-	21
Factores pronósticos del adenocarcinoma prostático.-.....	22
Factores pronósticos de categoría I.....	22
<i>Estadio Tumoral</i>	22
<i>Márgenes quirúrgicos</i>	23
<i>Antígeno prostático Específico (PSA) sérico preoperatorio</i>	23
Definición de términos básicos.....	23
Fundamentación legal.....	25
Hipótesis	27
Variables de Investigación	28
CAPITULO III.....	30
METODOLOGÍA	30
Diseño de la investigación.....	30
Población y muestra	31
Operacionalización de Variables	31
Técnicas e instrumentos para la recolección de datos.....	32
Obtención de muestras	32
Análisis y procesamiento de muestras.....	34
<i>Extracción y purificación del ADN</i>	34
<i>Extracción de ADN a partir de piezas tumorales embebidas en parafina.-</i>	34
<i>Extracción de ADN a partir de muestras de sangre periférica 3-5ml (Extracción con sales)</i>	35
<i>Extracción de ADN a partir de muestras de sangre periférica, hasta 1ml (Wizard® Genomic DNA Purification Kit)</i>	37
<i>Extracción de ADN a partir de muestras de raspado bucal (PureLink™ Genomic)</i>	38
<i>Purificación del ADN</i>	38
<i>Análisis cualitativo y cuantitativo del ADN extraído.-</i>	39
<i>Amplificación del DNA mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).-</i>	39
<i>Amplificación de la repetición CAG</i>	41
<i>Amplificación de la repetición GGC</i>	42
<i>Purificación de productos de PCR.-</i>	43

<i>Secuenciación de las regiones amplificadas.-</i>	44
Validez y Confiabilidad de los instrumentos	46
Técnicas para el Procesamiento de Datos y Verificación de Hipótesis.....	46
<i>Secuenciamiento e Identificación de genotipos</i>	46
<i>Confirmación y Análisis de secuencias</i>	47
<i>Análisis estadístico de las repeticiones polimórficas</i>	47
CAPITULO IV.....	48
RESULTADOS.....	49
<i>Parámetros biomédicos de las muestras estudiadas</i>	49
<i>Parámetros clínico-patológicos de los individuos diagnosticados</i>	50
<i>Niveles preoperatorios del antígeno prostático específico (PSA)</i>	51
Variantes polimórficas de las repeticiones CAG y GGC del gen receptor de andrógenos.....	51
<i>Frecuencia y distribución de las repeticiones CAG</i>	53
<i>Frecuencia y distribución de las repeticiones GGC</i>	53
Análisis e interpretación de resultados	53
<i>Grado de Gleason relacionado al estadio tumoral</i>	53
<i>Grado de Gleason relacionado a los Márgenes Quirúrgicos positivos</i>	54
<i>Grado de Gleason relacionado a la Invasión a Vesículas Seminales</i>	54
<i>Grado de Gleason relacionado a presencia de Metástasis</i>	55
<i>Grado de Gleason relacionado a los niveles de PSA preoperatorio</i>	55
<i>Estadio tumoral relacionado a los Márgenes Quirúrgicos positivos</i>	55
<i>Estadio tumoral e Invasión a Vesículas Seminales</i>	56
<i>Estadio tumoral y Metástasis</i>	56
<i>Estadio tumoral relacionado a niveles de PSA preoperatorio</i>	56
Análisis estadístico de las Repeticiones CAG y GGC asociadas al riesgo de cáncer prostático. .56	
Análisis estadístico de las Repeticiones CAG y GGC asociadas a las variables clínicas.....	58
<i>Repetición ≤ 21 CAG asociada a las variables clínico patológicas</i>	58
<i>Repetición ≤ 16 GGC asociada a las variables clínico patológicas</i>	59
Análisis estadístico de las Repeticiones CAG + GGC combinadas, asociadas al riesgo de cáncer prostático y a cinco variables clínico patológicas.....	60
<i>Repeticiones ≤ 21 CAG + ≤ 16 GGC combinadas, asociadas al riesgo de cáncer prostático y a cinco variables clínico patológicas</i>	60

<i>Repeticiones ≤ 21 CAG + ≥ 17 GGC combinadas, asociadas al riesgo de cáncer prostático y a cinco variables clínico patológicas.</i>	61
Discusión de resultados	62
<i>Variables clínico-patológicas en adenocarcinomas prostáticos</i>	63
<i>Frecuencia y distribución CAG-GGC</i>	65
<i>Repeticiones CAG y GGC asociadas al cáncer prostático y variables clínico patológicas</i>	67
<i>Combinaciones CAG + GGC correlacionadas al cáncer prostático y variables clínico patológicas</i>	70
<i>Repeticiones CAG y GGC en muestras de población indígena</i>	72
CAPÍTULO V	73
CONCLUSIONES	73
RECOMENDACIONES	75
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	76
ANEXOS	¡Error! Marcador no definido.
TABLAS	¡Error! Marcador no definido.
GRÁFICOS.....	112

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Número estimado de nuevos casos y muertes por cáncer de próstata a nivel mundial.....	90
Anexo 2. Variación internacional: Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer de próstata.....	91
Anexo 3. Clasificación TNM (Tumor Nódulo Metástasis) del cáncer prostático.....	92
Anexo 4. Anexo 4. Diagrama de la gradación histológica de Gleason.....	93
Anexo 5. Receptor Androgénico en una célula prostática.....	94
Anexo 6. Localización cromosómica y estructura del gen receptor de andrógenos.....	95
Anexo 7 Consentimiento Informado.....	96
Anexo 8. Encuesta Biomédica.....	97

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Síntesis descriptiva de los parámetros biomédicos en la población control.....	98
Tabla 2. Síntesis descriptiva de los parámetros clínicos – patológicos.....	99
Tabla 3. Síntesis descriptiva de las muestras de población indígena.....	100
Tabla 4. Distribución y frecuencia de la repetición CAG respecto a los tres grupos de estudio.....	101
Tabla 5. Distribución y frecuencia de la repetición GGC respecto a los tres grupos de estudio.....	102
Tabla 6. Asociación estadística entre los distintos parámetros clínico-patológicos.....	103
Tabla 7 Asociación de riesgo decrecimientos CAG.....	104.
Tabla 8 Relación ≤ 21 CAG con cinco variables clínico patológicas.....	105
Tabla 9 Relación decrecimiento GGC	106
Tabla 10. Relación ≤ 16 GGC con cinco variables clínico patológicas.....	107
Tabla 11. Relación de riesgo ≤ 21 CAG + ≤ 16 GGC combinadas, entre casos controles.....	108
Tabla 12. Relación ≤ 21 CAG + ≤ 16 GGC combinadas, variables clínico patológicas.....	109
Tabla 13. Relación de riesgo ≤ 21 CAG + ≥ 17 GGC combinadas, entre casos controles.....	110
Tabla 14. Relación de riesgo ≤ 21 CAG + ≥ 17 GGC combinadas, con variables clínicas.....	111

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribución y frecuencia de la repetición CAG en los tres grupos de estudio.....112

Gráfico 2. Distribución y frecuencia de la repetición GGC en los tres grupos de estudio.....113

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE FILOSOFÍA, LETRAS Y CIENCIAS DE LA EDUCACIÓN
INSTITUTO SUPERIOR DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO ISIF
CARRERA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**REPETICIONES POLIMÓRFICAS CAG Y GGC DEL GEN RECEPTOR DE
ANDRÓGENOS COMO FACTORES DE RIESGO ASOCIADAS AL CÁNCER
PROSTÁTICO EN DETERMINADOS GRUPOS POBLACIONALES DEL ECUADOR**
2004-2010

Autor: Paulo César Robles Ruiz

RESUMEN

En Ecuador al igual que en otros países, el cáncer de próstata es una de la forma más frecuente de cáncer, constituyendo la segunda causa de muerte por cánceres en la población masculina. Al ser hormono dependiente se relaciona con hormonas esteroides, entre los genes relacionados con el metabolismo de los andrógenos se encuentra el gen receptor de andrógenos (AR), el exón 1 de este gen contiene dos trinucleótidos de repetición polimórfica (CAG y GGC). Para verificar la hipótesis planteada, de que alteraciones en el tamaño de estas repeticiones confieren riesgo, se realizó un estudio de caso-control conformado por alrededor de 256 individuos mestizos ecuatorianos. Determinando mediante técnicas moleculares que repeticiones ≤ 22 CAG y ≤ 21 CAG + ≥ 17 GGC se relacionan con un mayor riesgo de cáncer y estadios avanzados. Ya que el factor étnico ha sido reconocido como un factor de riesgo importante, también se analizaron 78 individuos pertenecientes a poblaciones indígenas y los rangos de repetición los relacionan a poblaciones con baja incidencia. Concluyendo que las repeticiones CAG y GGC podrían estar relacionadas con el riesgo de cáncer prostático en nuestro país.

PALABRAS CLAVE: CÁNCER DE PRÓSTATA, GEN RECEPTOR ANDRÓGENOS, REPETICIÓN POLIMÓRFICA, GENÉTICA HUMANA, HORMONAS ESTEROIDES, FACTOR ÉTNICO.

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE FILOSOFÍA, LETRAS Y CIENCIAS DE LA EDUCACIÓN
INSTITUTO SUPERIOR DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO ISIF
CARRERA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES

**GGC AND CAG POLYMORPHIC REPEATS IN THE ANDROGEN RECEPTOR GENE AS
RISK FACTORS ASSOCIATED WITH PROSTATE CANCER IN CERTAIN POPULATIONS
FROM ECUADOR**
2004-2010

Autor: Paulo César Robles Ruiz

ABSTRACT

In Ecuador, as in other countries, prostate cancer is one of the most common form of cancer, constituting the second cause of death by cancer in the male population. As relates hormone dependent steroid hormones, among genes related to the metabolism of androgens is the androgen receptor gene (AR), exon 1 of the gene contains two polymorphic trinucleotide repeat (CAG and GGC). To test the hypothesis, that changes in the size of these repeats confer risk, we conducted a case-control study consisting of about 256 Ecuadorian mestizos. Determining molecular techniques CAG repeats ≤ 22 and ≤ 21 CAG + ≥ 17 GGC are associated with an increased risk of cancer and advanced stages. Since the ethnic factor has been recognized as an important risk factor, also 78 men belonging to indigenous populations were analyzed and the ranges are repeatedly associated with low incidence populations. Concluding that the CAG and GGC repeats could be related to prostate cancer risk in our country.

KEYWORDS: PROSTATE CANCER, ANDROGEN RECEPTOR GENE, POLYMORPHIC REPEAT, HUMAN GENETIC, STEROID HORMONES,ETHNIC FACTOR.

INTRODUCCIÓN

En Ecuador como en el resto del mundo las tasas de incidencia y mortalidad del cáncer prostático siguen incrementándose, y a pesar de que se han determinado algunos factores de riesgo las bases genéticas de esta patología no son del todo claras. A la población ecuatoriana a razón de sus índices epidemiológicos se la clasifica como una población de riesgo medio y alto, sin embargo, las investigaciones en el campo de la Genética o Biología molecular de Adenocarcinomas prostáticos en nuestro país son escasas.

De esta forma se vinculan los capítulos del presente trabajo, donde el problema a analizar consistió en las repeticiones de longitud polimórfica relacionadas con el riesgo de adenocarcinoma prostático, los objetivos se centraron en la caracterización de secuencias de ADN como las regiones CAG y GGC del Exón 1 del gen Receptor de Andrógenos, que podría constituir una valiosa herramienta en la determinación de marcadores moleculares asociados al riesgo de cáncer prostático, y dado que la población ecuatoriana es muy diversa, el analizar a distintos grupos poblacionales podría aportar al entendimiento del porque este tipo de cáncer está directamente relacionado a factores étnicos.

El marco teórico está conformado mediante la referencia de investigaciones que establecen la presencia o ausencia de alelos de riesgo y rangos de repetición polimórfica en distintas poblaciones; esto se fundamenta mediante publicaciones científicas referentes a la caracterización, epidemiología, etiología del cáncer prostático y dilucidación de las secuencias genéticas a analizarse en esta investigación. Es así que, repeticiones de ≤ 21 CAG + ≤ 16 GGC o ≥ 17 GGC fueron considerados como alelos de riesgo dentro del planteamiento de la hipótesis.

El capítulo de la metodología describe el enfoque epidemiológico del presente trabajo, las muestras seleccionadas dentro de la población afecta, control y nativa, además de las técnicas e instrumentos que permitieron establecer los rangos de repetición AR CAG_GGC. Para analizar su potencial como posibles indicadores de riesgo, en el análisis de resultados se incluyó estadísticos epidemiológicos y pruebas de determinación de riesgo como los (OR).

El capítulo final hace referencia a las repeticiones polimórficas CAG y GGC relacionadas con el riesgo de cáncer prostático y variables clínico patológicas, se recomienda que los hallazgos de esta investigación sean analizados con prudencia, ya que, no constituyen marcadores moleculares definitivos de riesgo, diagnóstico o tratamiento de este tipo de cáncer.

CAPITULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

El cáncer constituye un grave problema de salud a escala mundial, afecta a todos los países, independientemente de su origen étnico, cultura, nivel de desarrollo económico y sistema político. (Posada Fernández, y otros, 2000)

Es una de las principales causas de mortalidad en todo el mundo. (OMS, <http://www.who.int/es/>, 2012). Se prevé que entre 2007 y 2030, aumentará 45% la mortalidad por cáncer, pues se estima que pasara de 7.9 a 11.5 millones de defunciones por año, resultado del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población; además, durante el mismo periodo, el número de casos nuevos aumentará de 11.3 a 15.5 millones. (OMS, <http://www.who.int/es/>, 2009)

En América Latina y el Caribe, después de las enfermedades cardiovasculares, el cáncer es la segunda causa de muerte y para el 2030, se proyecta que más de 1,6 millones de personas morirán de cáncer (PHAO, 2008).

En Ecuador y de forma similar al resto del mundo, las muertes por cáncer han aumentado preocupantemente. Para 1994 la tasa bruta de mortalidad fue de 51.2 por cada 100.000 habitantes, alcanzando un cifra de 60.5 en el año 2005. (INEC, 2005). Es así que para el año 2010 el cáncer, como entidad patológica y no como tipo de cáncer, ocupa entre las principales causas de mortalidad la posición número doce. (INEC, 2010)

Dentro de los tipos de cáncer que afectan a la población masculina, destaca el cáncer prostático, que a razón de su morbilidad y mortalidad constituye uno de los problemas sanitarios más relevantes, ejerciendo un gran impacto social, económico o sobre la calidad de vida.

Hasta la actualidad no existe una tasa de incidencia que abarque de forma global a Latinoamérica respecto al cáncer prostático, sin embargo, se observa que en los países que cuentan con registros, el número de casos va en aumento. (Curado, Edwards, Shin, & Storm, 2007). A pesar de

que las causas específicas del cáncer de próstata siguen siendo desconocidas, y los mecanismos moleculares que intervienen en su origen y desarrollo no están del todo claro; los avances científicos centrados en la caracterización del material genético cada vez están más próximos en descifrar el proceso que hace que una célula prostática normal mute y llegue a convertirse en cancerosa; en este sentido, destacan las mutaciones de genes específicos que predisponen a las personas a determinadas neoplasias

En el presente trabajo se caracterizó molecularmente la frecuencia de repetición en los trinucleótidos CAG (Citosina, Adenina Guanina) y GGC (Guanina Guanina Citosina) en Exón 1 del gen Receptor de Andrógenos, respecto al origen o desarrollo tumoral prostático en la población masculina ecuatoriana.

Formulación del problema

El normal desarrollo de las células prostáticas depende de hormonas esteroideas como los andrógenos. (Velasco, 1998) (Cynthia, Chang, & Chang, 2004; Rojas Durán, y otros, 2011).

En el grupo de genes metabólicamente relacionados con los andrógenos se encuentra el gen Receptor de andrógenos (AR), que participan activamente en el crecimiento y desarrollo celular del epitelio prostático, manteniendo la estructura y función normal de esta glándula; además interviene en el desarrollo y progresión de patologías asociadas a la edad de los hombres como son la Hiperplasia Prostática y el Cáncer prostático (CaP), constituyendo un blanco terapéutico de relevancia. (Binnie, Freda, Heald, & Fouad, 2005; Zhu & Kyprianou, 2008)

A pesar de que mutaciones somáticas en el gen receptor de andrógenos han sido reportadas en tumores prostáticos de etapa avanzada (Gaddipati, y otros, 1994; Buchanan, y otros, 2001), el crecimiento de la mayoría de las formas tempranas de este tipo de cáncer requiere de la actividad normal de este gen (Irvine, Yu, Ross, & Coetzee, 1995; Chmelar, Buchanan, Need, Tilley, & Greenberg, 2007).

El exón 1 del gen AR contiene dos trinucleótidos de repetición polimórfica: la repetición Citosina Adenina Guanina (CAG) y la repetición Guanina Guanina Citosina (GGC) (Chamberlain,

Driver, & Miesfeld, 1994) (Chamberlain, et al 1994); diversos estudios han relacionado a estos microsatélites como factores de riesgo para el cáncer de próstata, sin embargo, los resultados no son concluyentes. (Chang, y otros, 2002)

Aunque en la actualidad se mantienen dudas acerca de este mecanismo de mutación en el desarrollo de ciertos tipos de cáncer, no existe información genética-molecular del papel de los tripletes CAG-GGC en los adenocarcinomas prostáticos de la población ecuatoriana; el dilucidar este punto que está enmarcado en el rol de la inestabilidad de trinucleótidos repetidos, constituye una interesante herramienta en la caracterización de poblaciones de alto riesgo como la del Ecuador. Por los antecedentes expuestos es primordial formular la siguiente pregunta:

¿La caracterización molecular de la repeticiones polimórficas CAG y GGC aporta evidencia para ser consideradas como factor de riesgo en el cáncer prostático?

Preguntas directrices

¿Cuál es la función específica del gen Receptor de Andrógenos en el ciclo celular prostático y cuáles podrían ser las posibles razones que lleven a una progresión tumoral?

¿Cuáles podrían ser los rangos de repetición CAG y GGC relacionados al riesgo de cáncer prostático?

¿El número de repeticiones CAG y GGC, se relaciona con la variación étnica y como este hecho caracteriza molecularmente a la población ecuatoriana?

¿Las variables clínicas patológicas en los adenocarcinomas prostáticos se relacionan con la distribución y frecuencias de los trinucleótidos CAG o GGC?

Objetivos

Objetivo General.-

- Determinar si la longitud de las repeticiones CAG y GGC en el exón 1 del gen Receptor de Andrógenos constituyen factores de riesgo del Cáncer prostático en determinados grupos poblacionales del Ecuador.

Objetivos Específicos.-

- Establecer el número de repeticiones CAG y GGC del Exón 1 del gen receptor de andrógenos en adenocarcinomas prostáticos y en la población control.
- Comparar las frecuencias de repeticiones polimórficas CAG y GGC entre los adenocarcinomas prostáticos y la población control.
- Analizar las variables clínico- patológicas de las piezas tumorales que constituyan marcadores pronósticos relevantes y que se relacionen entre sí.
- Relacionar de forma individual y combinada, los alelos de riesgo de las repeticiones CAG y GGC con el cáncer prostático y sus variantes clínico-patológicas.
- Caracterizar la repetición CAG y GGC en determinadas poblaciones indígenas del Ecuador.
- Analizar otras posibles variantes genéticas que presenten las regiones amplificadas del exón 1 del gen Receptor de Andrógenos.

Justificación

Numerosos descubrimientos relacionados con la identificación de genes de predisposición hereditaria al cáncer, han aportado con valiosa información al campo del diagnóstico genético, y en la aplicación de métodos de tratamiento más eficaces, los perfiles genéticos en poblaciones con alto riesgo de recurrencia, constituyen indicadores confiables en la caracterización de células y tejidos cancerosos. Por tal motivo, el analizar secuencias de longitud polimórfica en poblaciones con elevadas tasas de incidencia y mortalidad de cáncer prostático como la del Ecuador, aportara al conocimiento científico respecto a los cánceres hereditarios y la determinación de individuos de alto riesgo.

Uno de los factores de riesgo vinculados al cáncer prostático es el componente étnico. Entre los conglomerados humanos con bajas tasas de incidencia y mortalidad de cáncer prostático, se encuentra la población asiática, grupo étnico que comparte un importante vínculo genético con poblaciones nativas del Ecuador. En nuestro país no existen registros de cáncer prostático en población indígena, por lo que determinar variantes genéticas asociadas a factores de protección, constituye un gran aporte a la valoración del riesgo de los individuos en función de su origen étnico.

Grandes avances en epidemiología, señalan que la investigación en el campo de la genética molecular tiene una función cada vez más importante en el diagnóstico y estudio de tumores sólidos, por lo que la aplicación de protocolos utilizados en el análisis de longitudes polimórficas aportara a la estandarización de técnicas utilizadas en laboratorios de biología molecular.

Limitaciones

En Ecuador los sistemas de registros y seguimiento del cáncer proporcionan valiosa información acerca de la epidemiología del cáncer prostático, sin embargo, esta, no es del todo actualizada, la última publicación del Registro Nacional de tumores corresponde a casos diagnosticados durante el periodo 2003 – 2005, y constituyó la principal limitante en este estudio, ya que al no contar con tasas de incidencia y mortalidad vigentes, el uso de estimaciones se hace obligatorio, sin poder concluir con exactitud el total de la población afecta.

Los registros entre las pocas ciudades que cuentan con este tipo de información no resultan comparables, debido a la gran heterogeneidad de la población ecuatoriana y la presencia de los llamados factores de confusión, como el factor étnico, información poco valorada en el diagnóstico oncológico en los diferentes centros de patología a nivel nacional.

CAPITULO II

MARCO TEORICO

Antecedentes del problema

El cáncer prostático fue identificado por primera vez en 1853, desde entonces se han alcanzado avances significativos en la detección y pronóstico, así como mejoras en la cirugía, radiación y el tratamiento médico oncológico. (Denmeade & Isaacs, 2004). De entre todos estos adelantos, se han identificado algunos genes que intervienen directa o indirectamente en la biología específica de cáncer de próstata, destacando el rol del Gen Receptor de Andrógenos (AR).

Existen una gran variedad de enfermedades, además del cáncer de próstata, en las que la mutación o el mal funcionamiento del AR ha sido reconocida, además de otras patologías no tumorales relacionadas directamente con la variabilidad de repeticiones polimórficas (Sánchez, y otros, 2004).

Dado que la repetición AR-CAG tiene actividad transcripcional inversa, las repeticiones cortas CAG han sido asociadas con una mayor funcionalidad del Receptor de Andrógenos y por ende con el cáncer prostático; sin embargo el estudio: CAG repeat number is not inversely associated with androgen receptor activity in vitro (Nenonen, y otros, 2010), reporta no encontrar dicha relación, sugiriendo que los estudios “in vivo” concernientes al número CAG y sus efectos androgénicos son conflictivos, este ensayo “in vitro” reporta una mayor actividad del gen con 22 CAG y no con 16 repeticiones. Entre las investigaciones más recientes y relevantes, que evalúan la aparente relación causal, entre la longitud anormal de la repetición AR CAG-GGC con el origen y progresión del cáncer prostático se encuentran:

A Large Study of Androgen Receptor Germline Variants and Their Relation to Sex Hormone Levels and Prostate Cancer Risk. Results from the National Cancer Institute Breast and Prostate Cancer Cohort. Esta importante investigación constituye uno de los estudios más grandes relacionados al presente proyecto de grado, se analiza la secuencia completa del receptor de andrógenos con hormonas sexuales circundantes y el riesgo de cáncer prostático en 6058 adenocarcinomas y 6725 controles de origen Caucásico, determinando que no existe relación entre las

variantes genéticas del gen y el cáncer de próstata, además señala una fuerte asociación entre largas repeticiones CAG y elevados niveles de testosterona y estradiol. (Lindstrom, y otros, 2010).

Si-Yi Hu, en una investigación del año 2010: Identification of a novel germline missense mutation of the androgen receptor in African American men with familial prostate cancer, analiza la repetición AR CAG-GGC tomando en cuenta la variación étnica y registros familiares de cáncer prostático, determina que existen diferencias en cuanto a la distribución de las frecuencias de repetición, es así que el alelo más frecuente en Afro-Americanos es de 23 CAG y de 12, 23 y 26 CAG en Caucásicos; en lo referente a la repetición GGC, 23 repeticiones constituyen el alelo más frecuente para ambos grupos. En relación al riesgo de cáncer prostático y los alelos de riesgo ≥ 22 CAG y ≤ 16 GGC no existen datos de significancia estadística.

Androgen receptor CAG repeat length is not associated with the risk of incident symptomatic benign prostatic hyperplasia: Results from the prostate cancer prevention trial (Kristal, y otros, 2009) y Androgen Receptor CAG Repeat Length and Association With Prostate Cancer Risk: Results From the Prostate Cancer Prevention Trial (Price, y otros, 2010) se encuentra entre las publicaciones más recientes, en las que se estipula que no existe relación entre la repetición CAG y el riesgo a la Hiperplasia prostática y cáncer prostático respectivamente.

En contraste de los anteriores trabajos, existe una gran cantidad de artículos que establecen la relación AR CAG-GGC y Cáncer prostático, y a pesar de no ser recientes, por su relevancia referente a la determinación de alelos de riesgo así como también por ser los pioneros en analizar estas repeticiones polimórficas es necesario citarlos.

The CAG and GGC Microsatellites of the Androgen Receptor Gene Are in Linkage Disequilibrium in Men with Prostate Cancer (Irvine, Yu, Ross, & Coetzee, 1995) reportan por primera vez que repeticiones cortas CAG se relacionan con una elevada función de la actividad transcripcional, posiblemente dando lugar al cáncer prostático, es así que al combinar los llamados “alelos de riesgo” < 22 CAG y ≤ 16 GGC se determinó un índice de riesgo de 2; en cuanto a la distribución de las frecuencias de las repeticiones, fue notable los promedios más grandes en poblaciones con bajas tasas de mortalidad e incidencia como la asiática.

Polymorphic GGC repeats in the androgen receptor gene are associated with hereditary and sporadic prostate cancer risk (Chang, y otros, 2002), que determinó uno de los índices de riesgo más

altos relacionados con la repetición GGC, es así que se determinó un OR de 2,66 para repeticiones ≤ 16 GGC.

Entre los escasos trabajos referentes a la caracterización de este tipo de secuencias en la región de Sur América podemos citar:

Polymorphic CAG and GGC Repeat Lengths in the Androgen Receptor Gene and Prostate Cancer Risk: Analysis of a Brazilian Population. (Silva, y otros, 2008), en donde los promedios de repetición en la población afecta no se diferenciaron de la población control en ninguno de los dos tripletes; sin embargo el riesgo de cáncer de próstata fue mayor para las repeticiones ≥ 21 CAG determinando un OR = 2.46 (95% CI 0.98–6.18); con respecto a la repetición GGC no se determinó riesgo para repeticiones ≤ 17 y 17 (OR = 1.13 [95% CI 0.47 –2.75]). Concluyendo que el menor número de repeticiones CAG y el total de repeticiones (CAG + GGC) podrían estar asociadas con un mayor riesgo del cáncer prostático.

Tal como lo indican las publicaciones citadas, no existe información concluyente que establezcan o descarte a la repetición polimórfica CAG o GGC con factor de riesgo, los resultados en muchos casos son contradictorios y se encuentran fuertemente relacionados con el factor étnico.

Fundamentación Teórica

Cáncer de Próstata

Generalidades acerca del Cáncer.-

El cáncer es el nombre de una variedad de al menos cien enfermedades muy diferenciadas entre sí, y que se caracterizan por el crecimiento excesivo y descontrolado de células que invaden y dañan tejidos y órganos, si la propagación cancerosa abarca órganos vitales se puede producir la muerte del individuo. Las células cancerosas se dividen a mayor velocidad que el resto de los tejidos, perdiendo el control de su propio desarrollo y sin cumplir las funciones para las que fueron originadas. (Thompson, McInnes, & Willard, Genetics, 1991; Instituto Nacional de Cancerología ESE, 2004)

El proceso carcinogénico deriva de dos etapas sucesivas: proliferación celular aumentada denominada tumor o neoplasia y capacidad invasiva denominada metástasis. La primera etapa se la considera como un tumor benigno y tiene lugar únicamente en células que no han salido de su ubicación de origen y cuya curación completa se da generalmente por extirpación quirúrgica; el segundo caso se denomina tumor maligno o cáncer, estas células son capaces de invadir tejidos circundantes, o distantes después de penetrar en el torrente circulatorio sanguíneo o linfático en un proceso denominado metástasis, las metástasis son las responsables de la gran mayoría de fallos en los tratamientos y, por tanto, de la gran mayoría de las muertes por cáncer. (Muñoz, Genes y nuevas Terapias, 1997). Para que todo el proceso tumoral se presente se necesita de tres fases básicas: iniciación, promoción y progresión. En la iniciación el ADN presenta un daño crítico que se hace permanente en la célula, este daño puede originarse debido a que la célula se replica antes de que los mecanismos de reparación actúen o por fallas en el sistema de reparación. En la promoción determinados sucesos epigenéticos intervienen de forma selectiva en la proliferación de las células cancerígenas, mientras que en la progresión se desarrollan cambios hereditarios más profundos que surgen a medida que la población celular aumenta y se desarrolla el cáncer. (Figuroa, 2008). Por otra parte la inestabilidad genética de las células cancerosas y sobre todo el aumento en la velocidad de división las vuelve más competitivas frente a las células normales en el proceso de selección natural. (Muñoz, Genes y nuevas Terapias, 1997)

Los cánceres son de origen multigénico y multifactorial, se han determinado más de cien tipos, todos con causas y síntomas diferentes y sus subdivisiones se determinan de acuerdo al tejido

específico de la célula, localización anatómica y las características citológicas del tumor. (Malcom, 2001)

Bases Genéticas del Cáncer.-

El cáncer en definitiva es el resultado de la acumulación de múltiples cambios genéticos o mutacionales (Cossman, 1990; Thompson, Maclannes, & Willard, *Genética en Medicina*, 1996), y sin embargo estos defectos genéticos hereditarios, no explican es su totalidad la morbilidad (Raya, 2006). Las alteraciones que se dan durante el proceso de carcinogénesis afectan esencialmente a protooncogenes y oncogenes, genes supresores de tumor, genes reparadores y genes de apoptosis (Luque & Hernandez, 2001; Pierce, 2006).

Los protooncogenes codifican proteínas que pueden influenciar el ciclo celular; favoreciendo su progresión o inhibiendo los procesos normales de muerte celular programada llamada apoptosis, estos genes pueden estar activos o reprimidos, dependiendo la etapa del desarrollo en que se encuentra el organismo, produciendo proteínas defectuosas en su estructural o cantidad, este proceso por el cual los protooncogenes se alteran constituye el mecanismo de activación de oncogenes (Brandan, Juaristi, Aguirre, & Romero- Benítez, 2002).

Los oncogenes son, en realidad, alelos mutados activados de protooncogenes, usualmente se originan por mutaciones de ganancia de función que conllevan a la transformación maligna por mecanismos como la estimulación de la proliferación, incremento del suplemento sanguíneo al tumor y la inhibición de la apoptosis. La mutación activadora puede ser en el mismo oncogén, en su regulación o en su número de copias genéticas, presentan un fenotipo dominante, es decir, cuando se activan o se sobre expresan un solo alelo mutado basta para cambiar el fenotipo celular de normal a maligno (Thompson, y otros, 2001).

En la gran mayoría de los cánceres la transformación maligna es resultado de la combinación de la activación de oncogenes y la anormal inactivación de los genes supresores de tumores, que son activadores de procesos apoptóticos o bloqueantes del progreso del ciclo celular. La alteración de la expresión genética de estos genes son similares a los de activación de oncogenes, en la mayoría de los tipos de cáncer se presenta la pérdida o mutación de uno o más genes supresores de tumores que presentan carácter recesivo, es decir se necesita la alteración de ambos alelos del gen para provocar la alteración fenotípica (Brandan, Juaristi, Aguirre, & Romero- Benítez, 2002).

Otro grupo de genes de gran relevancia en el proceso carcinogénico son los genes de reparación del DNA que son responsables de rectificar los errores producidos en la incorporación de los nucleótidos durante la replicación del DNA, y de reparar las alteraciones inducidas por radiaciones o agentes químicos. La mutación producida en los genes de reparación de errores durante la replicación del DNA conlleva a la aparición de múltiples mutaciones en el genoma (Muñoz, Genes y nuevas Terapias, 1997).

Es necesario reconocer que el cáncer puede ser ocasionado por agentes físicos, químicos y biológicos; la mayoría de estos constituyen agentes externos que alteran nuestros genes o a veces a fallos en los procesos celulares intrínsecos, es decir, dentro del componente genético los agentes ambientales, que pueden actuar como mutágenos provocando alteraciones somáticas responsables de la carcinogénesis. Algunos de los factores ambientales promotores de la carcinogénesis son: radiación, carcinógenos químicos, hidrocarburos agentes biológicos, etc, (Nussbaum, McInnes, & Willard, 2001; Paz-yMiño, y otros, 2002)

Epidemiología del Cáncer de Próstata.-

El cáncer de próstata es foco de una inmensa atención en investigación, ya que por su elevada incidencia, a nivel mundial constituye el segundo cáncer más común en la población masculina. En el último registro realizado en el 2008 se detectaron aproximadamente 910 000 casos de cáncer de próstata, representando alrededor del 14 por ciento de todos los nuevos casos de cáncer en los hombres; además se prevé que el número de casos casi se duplicará a 1,7 millones para el 2030 (International World Cancer Research Foundation, 2008).

Las tasas de incidencia más altas durante los últimos años se presentaron en: Australia, Nueva Zelanda, Europa Noroccidental y América del Norte; las tasas más bajas a nivel mundial se registran en Asia. Dentro del continente Africano, la tasa más alta fue en el sur de África y la más baja en el norte de África, mientras que, en Europa, las tasas más altas se encontraban en Europa occidental y septentrional, y las más bajas en Europa Central y Oriental (GLOBOCAN, 2008). (Anexo 1)

Tomando en cuenta lo anteriormente descrito tenemos que, Australia presenta las tasas de incidencia y mortalidad más elevadas de todo el mundo, en esta población se diagnostican alrededor de 20.000 nuevos casos al año, de los cuales 3.300 mueren por esta causa. El cáncer prostático

constituye la segunda causa más común de muerte por cánceres donde se diagnostican 32 casos cada día y fallece un hombre cada tres horas (Prostate Cancer Foundation of Australia, 2012). (Anexo2)

En Ecuador, un total de 954 casos de cáncer han sido diagnosticados durante el 2011 en SOLCA, de los cuales, 70 casos corresponden al diagnóstico de Adenocarcinoma prostático (El diario, 2012). De todos los casos diagnosticados de cáncer en hombres, el 22% corresponde a cáncer de próstata, es decir que de cada cuatro casos en nuestro país, uno es de próstata. Información del Registro Nacional de Tumores, determina que el número de estos casos se ha incrementado considerablemente, es así que, desde 1985 con una tasa de incidencia estandarizada de 23.7 por cada 100.000 habitantes, se ha incrementado hasta una tasa de 48.9 por cada 100.000 habitantes para el año 2002 (Corral, Cueva, & Yopez, 2004)

Según el último registro de Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, en nuestro país, la tasa de mortalidad de cáncer de la próstata es de 12,2 por 100.000 habitantes, ubicándolo como la segunda causa de muerte por cáncer (INEC, 2010), registrando 868 muertes que constituyen el 2,5% del total de casos de cáncer presentados.

En los hombres residentes en Quito entre el periodo 2003-2005, el cáncer de próstata tuvo una tasa de incidencia estandarizada de 48,9 por cada 100.000 habitantes, la ciudad de Guayaquil registra una incidencia de 22,9 y la ciudad de Loja una de 24,9 (Registro Nacional de Tumores, 2009).

Etiología del Cáncer de Próstata

La incidencia de un tipo de cáncer determinado, varía según la edad, el sexo, la etnia, la geografía o incluso en ocasiones del estrato social (Muñoz, Genes y nuevas Terapias, 1997); a pesar de su alta incidencia y mortalidad, la etiología del cáncer prostático todavía es inconclusa (Ntais, Polycarpau, & Tsatsoulis, 2003). Entre los factores de riesgo que promueven el desarrollo de esta enfermedad se encuentra; la edad, grupo étnico, y antecedentes familiares, identificándose también otros posibles promotores como: niveles hormonales, dieta, actividad física, tamaño corporal, consumo de bebidas alcohólicas, hábito de fumar, comportamiento sexual, exposiciones ocupacionales y alteraciones genéticas como mutaciones o determinados polimorfismos. (Hughes, Murphy, Martin, & Sheils, 2005)

Edad.-

Existe un incremento exponencial del riesgo de cáncer de próstata con la edad, en el que también está implicado el aumento de las exposiciones a todo tipo de agentes carcinógenos externos (Muñoz, Genes y nuevas Terapias, 1997). Este tipo de cáncer es poco frecuente en hombres de menos de 40 años y considerado común en hombres entre 50 y 70 años, aproximadamente el 60% de los cánceres de próstata son diagnosticados en hombres de 65 años o más, siendo la media de diagnóstico los 72 años (American Society of Clinical Oncology, 2010).

Grupo étnico.-

En adenocarcinomas prostáticos agrupados según sus características étnicas, es notable que el material genético presente características que favorecen la aparición de tumores. La etnia negra al poseer niveles mas altos de dihidrotestosterona que otros grupos étnicos, presentan mayor riesgo de presentar cáncer prostático, es así, que el riesgo para la población blanca es de un 3.5% y para la etnia negra de un 4.3% (Uribe, 2004), los Afroamericanos tienen más probabilidades de desarrollar cáncer de próstata a una edad más joven y de tener tumores agresivos de crecimiento rápido. Las poblaciones asiáticas tienen las tasas de incidencia mas bajas, pero en contraste investigaciones epidemiológicas han descubierto que estos grupos humanos, adquieren un riesgo comparable al de la población caucásica residentes en Estados Unidos (Pallarés, 2004).

Se desconocen los motivos exactos para estas diferencias, y probablemente se vinculen con factores socioeconómicos y biológicos (American Society of Clinical Oncology, 2010).

Antecedentes Familiares.-

Al parecer el cáncer de próstata afecta más, a algunas familias que a otras, relacionándolo con la presencia de un factor hereditario o genético, del total de casos de cáncer prostático, entre el 5 y 10% presentan alguna base hereditaria (Postma & Schröder, 2005). Si el carcinoma prostático hereditario se presenta en tres familiares en primer grado de consanguinidad y en tres generaciones sucesivas, o dos parientes antes de 55 años, la incidencia general de este tipo de cáncer prostático es de 14% para todas las edades, y se calcula que equivale a un 43% de los casos tempranos en menores de 55 años, confiriendo la siguiente escala de riesgo: Un familiar con cáncer de próstata presenta dos

veces mas riesgo, dos familiares presenta cinco veces mayor riesgo y tres familiares presentan 11 veces mayor riesgo (Cossman, 1990)

Dieta.-

No existen estudios que demuestren de forma concluyente que la alimentación y la nutrición puedan causar o prevenir el cáncer de próstata; pero es posible que exista un vínculo (ASCO, 2010).

En este punto destacan el consumo de grasa saturadas que aumentan los metabolitos androgénicos y en general las hormonas sexuales, las dietas ricas en calcio inhiben el 1-25D3 (metabolito activo de la vitamina D), dietas bajas en selenio fundamental para el (Glutación peroxidasa) o las que implican un alto consumo de Penylimidazopiridina presente en las carnes o alimentos carbonizados, siendo todos estos factores relacionados con los Adenocarcinomas prostáticos esporádicos (Harber, 2001).

Sin embargo, alimentos ricos en licopeno, vitamina D y E, selenio, pescado y productos de soya, han sido asociados con una reducción en el riesgo (Postma & Schröder, 2005), es posible que alimentos con estos compuestos presenten propiedades anticancerígenas, ya que son importantes antioxidantes que ayudan a reducir el daño al material genético (Pallarés, 2004; Sim & Cheng, 2005).

Es importante aclarar que modificaciones específicas en la dieta pueden no detener ni retardar el desarrollo de esta patología y es posible que dichos cambios deban iniciarse en etapas tempranas de la vida para tener algún efecto (ASCO, 2010).

Otros factores de riesgo.-

El consumo de tabaco, bebidas alcohólicas, la vasectomía, hiperplasia prostática benigna, obesidad, sedentarismo, exposición a determinado tipo de radiación, virus de transmisión sexual entre otras han sido relacionadas al cáncer de próstata ya sea como factores promotores, de riesgo o de mal pronóstico, pero aun no se ha llegado a establecer su verdadero rol en este proceso patológico (American Society of Clinical Oncology, 2010; ASCO, 2010).

Función de los Andrógeno y actividad metabólica.-

La próstata es un órgano andrógeno dependiente y este punto es fundamental para entender los mecanismos que explican el cáncer prostático, por lo tanto, los genes que están involucrados en el camino de señalización y metabolismo de los andrógenos, han sido implicados como factores para la iniciación y progresión del cáncer de próstata. El ciclo celular en la próstata esta mediada por la interacción entre el receptor androgénico y los andrógenos que viajan por el torrente sanguíneo (Uribe, 2004).

Los andrógenos son hormonas sexuales masculinas, constituyen los principales esteroides sexuales del macho y son responsables del desarrollo fenotípico masculino durante la embriogénesis y la maduración sexual en la pubertad (Heemers & Tindall, 2007), la testosterona es el principal andrógeno circulante en el hombre y la dihidrotestosterona (DHT) es su metabolito más activo, participando en varios procesos biológicos como el desarrollo normal del pene, escroto, testículos, glándulas sexuales accesorias y características sexuales secundarias en la pubertad (So, Hurtado-Coll, & Gleave, 2003; Heemers & Tindall, 2007).

El 95% de los andrógenos son producidos en las células de Leydig en el testículo, estas células obtienen el colesterol del plasma a partir de los ésteres de colesterol que son necesarios en este proceso metabólico (Luke & Coffey, 1994), las glándulas adrenales producen el restante 5% de los andrógenos del cuerpo, estos andrógenos adrenales se denominan androgenosterona y dehidroandrosterona que se convierten a testosterona en los tejidos periféricos de la glándula prostática (Abrahamsson & Bostwick, 2000). Estas hormonas son mediadores de la influencia estromal sobre el epitelio glandular, la mas importante es la testosterona que actúa sobre el receptor de andrógenos a través de la dihidrotestosterona (DHT), esta conversión de testosterona a DHT necesita de 5 alfa reductasa, isoenzima 2 producida en el estroma prostático (Anexo 5) (Partin & Coffey, 1998; Small, Prins, & Taplin, 1999; Bostwick, Human prostate cancer risk factors, 2004). Otro importante grupo de mediadores son los estrógenos que pueden ser aromatizados a andrógenos en una reacción irreversible siendo esto parte de la génesis en la Hiperplasia prostática benigna (HPB), pero también del adenocarcinoma prostático (Harber, 2001).

Debido a que los andrógenos participan activamente en el desarrollo celular de esta glándula han sido relacionados con el desarrollo del cáncer prostático, esta teoría ha sido planteada a raíz de ciertos ensayos en donde se ha observado que hombres castrados antes de la pubertad e individuos

pseudohermafroditas no desarrollan este tipo de cáncer (Ntais, Polycarpau, & Tsatsoulis, 2003; National Cancer Institute, 2010).

Receptor nuclear androgénico y metabolismo prostático.-

Los mecanismos de acción que regulan la acción de las hormonas esteroideas están regulados a través de receptores específicos tales como el receptor de andrógenos, estrógenos, progesterona, glucocorticoides y mineralcorticoides. El receptor de andrógenos pertenece a la denominada superfamilia de los receptores nucleares, son factores de transcripción ligando dependientes que regulan la expresión de genes diana uniéndose a elementos específicos del ADN (Beato, Truss, & Schuz, 1995). Este receptor se divide en seis regiones de estructura primaria, el extremo N-terminal contiene las regiones A y B que son altamente variables y contienen los dominios de transactivación del ADN (Sartorius, Melvilla, & Holvlad, 1994), la región C contiene el dominio de unión al ADN y es muy conservada, la región D o región bisagra es una muy variable de longitud y poco conservada entre los distintos receptores, el extremo C-terminal del receptor contiene las regiones E y F. La región E contiene dos zonas conservadas y comunes a todos los receptores nucleares cuya función es la unión al ligando además de funciones de transactivación del ADN y finalmente la región F que regula la unión del receptor al ligando (Baniahmad, Leng, & Burris, 1995).

Este receptor nuclear media los efectos biológicos de los andrógenos para el normal desarrollo de las células epiteliales prostáticas, manteniendo su estructura y función normal, también participa en el desarrollo y progresión de patologías como son la hiperplasia y el cáncer prostático (Dehm & Tindal, 2007; Zhu & Kyprianou, 2008). En lo que se refiere al cáncer de la próstata, juega un papel importante en neoplasias independientes y dependiente de andrógenos, como se ha señalado en estudios inmunohistoquímicos, sin embargo, existe una mayor expresión significativa de la proteína en el cáncer independiente de andrógenos (Edwards J. , Krishna, Grigor, & Bartlett, 2003) ,además ciertos estudios indican una asociación entre la expresión de este, con el pronóstico de la enfermedad o con la duración de la sensibilidad a la terapia hormonal (Taplin & Ho, The endocrinology of prostate cancer, 2001).

Además del cáncer de próstata, la mutación o el mal funcionamiento del receptor hormonal ha sido relacionada con distintas enfermedades, en este sentido destaca el síndrome de insensibilidad a los andrógenos que se caracteriza por su mal funcionamiento en presencia de concentraciones normales de andrógenos circulantes (concentración normal de testosterona plasmática) y de un normal

funcionamiento de la 5- α -reductasa tipo 2 (presencia de dihidrotestosterona celular). Este fenómeno de insensibilidad a los andrógenos puede ser completo o incompleto y se debe a mutaciones en el gen de receptor de andrógenos, son mutaciones de tipo germinal (presentes en todas las células del organismo) o somáticas (presentes en el cáncer de próstata afectando únicamente al tejido tumoral prostático) (Sánchez, y otros, 2004).

Gen Receptor de andrógenos (AR) en la patología prostática.-

La presencia de mutaciones en el receptor nuclear androgénico procede de mutaciones en el gen receptor de andrógenos (AR). Sin embargo, no todas las mutaciones en este gen provocan alteraciones en el receptor, estos cambios en la estructura del gen o polimorfismos deben considerarse como una posible inestabilidad genética o errores en los componentes de la síntesis o reparación del ADN, que podrían provocar una alteración morfológica y/o funcional (Sánchez, y otros, 2004).

El gen de este receptor hormonal androgénico es el gen receptor de andrógenos (AR), que se encuentra en el brazo largo del cromosoma X (qX 11-12), se divide en ocho exones con una longitud de 2730 pares de bases (pb). El dominio N-terminal se codifica por una secuencia que se encuentra en el exón 1, en los exones 2 y 3 se encuentra el dominio de unión al ADN y tienen 152 y 117 pb respectivamente, la región bisagra se codifica en el exón cuatro, y el dominio C-terminal se distribuye en los exones 4 al 8 que tienen un tamaño que va desde 131 a 288 pb (Anexo 6). Su ARN mensajero de 10 kilo bases que produce una proteína de 919 aminoácidos con una longitud de 90 kilo bases que codifica para una proteína que tiene tres dominios funcionales principales (Choong C. S., Kemppainen, Zhou, & Wilson, 1996). El primer exón contiene dos repeticiones de trinucleótidos que codifican una secuencia poliglutamina y otra poliglicina, la secuencia de poliglutamina está codificada por el triplete CAG y la de poliglicina por el tracto GGC.

Sánchez y otros (2004), determinaron que el porcentaje de mutaciones en el gen receptor de andrógenos en pacientes con tumor prostático localizado varía entre 0 y 20% y que el porcentaje de pacientes con este gen mutado es del 16,4%, además determinaron que la mayoría de las mutaciones se localizan en el exón 1 (5 mutaciones), seguido del exón 5 (dos mutaciones). Las mutaciones en el (AR) por lo general se presentan en tumores prostáticos de avanzado estado, por lo que se ha sugerido que el producto mutante de este gen, podría afectar el proceso molecular en que se fundamentan algunos procesos terapéuticos como la ablación de andrógenos (Taplin, Bubley, Shuster, & otros, 1995), además de que dichas mutaciones probablemente lleven a estadios avanzados patológicos.

Alteraciones en este gen, así como también interacciones con factores de crecimiento, cofactores, cromatina, mecanismos de post-traduccion y degradación podrían facilitar las condiciones para que las células cancerosas se desarrollen (Ross, y otros, 1995; Richter, Srivastava, & Dobi, 2007). El número de mutaciones identificadas en este gen depende de factores como el origen del tumor y estadio de la enfermedad. (Brive, Agus, & Ely, 2001)

Repeticiones polimórficas CAG y GGC del Receptor de Andrógenos (AR CAG-GGC).-

El exón 1 del gen receptor de andrógenos (AR) contiene al dominio N terminal y tiene una función de transactivación o activación de genes blanco. Este exón tiene dos repeticiones polimórficas formadas por un trinucleótido CAG (Citosina Adenina Guanina) en la región 5' que codifica poliglutamina y un trinucleótido GGC (Guanina Guanina Citosina) en la región 3' que codifica poliglicina (Ferlin, y otros, 2005; Davis-Dao, Tuazon, Sokol, & Cortesiss, 2007). Se ha reportado variantes en el número de repeticiones de estos trinucleótidos en la población general, definiéndolas como secuencias altamente polimórficas, los polimorfismos que afectan la secuencia codificante de la proteína en el dominio amino terminal (glutamina-glicina) se encuentran relacionadas con factores étnicos (Scaglia, 2008).

Las repeticiones CAG comienzan en el aminoácido 58, tiene entre 11 y 31 repeticiones y es seguida por la secuencia CAA que es constante (CAG)_nCAA. Las repeticiones GGC se inician en el aminoácido 442 ó 479 dependiendo de las repeticiones CAG y son codificadas por (GGT)₃GGG(GGT)₂(GGC)_n, aparecen constantes seis repeticiones de glicina (GGT/GGG), seguidas por repeticiones GGC que se repite entre 4 y 24 veces (Scaglia, 2008; NCBI, 2012). La repetición CAG tiene una longitud normal de entre 8 a 35 repeticiones con un promedio de 20, mientras que la longitud normal GGC contiene de 4 a 21 repeticiones siendo las 16GGC el alelo mas común (Irvine R. , Yu, Ross, & Coetzee, 1995).

La extensión o contracción en la repetición de un trinucleótido pueden afectar la expresión del gen y la función de la proteína produciendo cambios genotípicos. Según lo ilustrado por el receptor del andrógeno y su repetición polimórfica CAG o GGC, podrían implicarse en la generación neoplásica de varios tejidos finos (Edwards, Hammond, Jin, Caskey, & Chakraborty, 1992). Los polimorfismos en la repetición CAG ha sido relacionada con distintas patologías femeninas como: hirsutismo, síndrome de ovarios poliquísticos, cáncer de mama, mientras que, en los hombres se la ha relacionado con

síndrome de Kennedy, insensibilidad parcial o total a los andrógenos, cáncer de próstata, azoospermia y oligospermia. Una hipótesis que se ha propuesto es que un número menor o una reducción de la repetición CAG, puede producir una actividad transcripcional más alta “in vivo” e “in vitro” lo que causaría un incremento en la activación de los genes dependientes de andrógenos, es decir la repetición CAG presenta una actividad transcripcional inversa (Choong, Kempainen, & Zhou, 1996) y para el caso del cáncer prostático esta reducción de CAG han sido relacionadas con mayor grado, mayor estadio, metástasis y cánceres fatales (Irvine R. , Yu, Ross, & Coetzee, 1995; Giovannucci, y otros, 1997; Ingles, y otros, 1997; Stanford, Just, & Gibas, Polymorphic repeats in the androgen receptor gene, 1997); sin embargo otros grupos no han identificado estas repeticiones como un factor de riesgo, y sugieren que este factor es menos importante de lo que se pensaba previamente (Cicek, y otros, 2004; Salinas, Austin, Ostrander, & Stanford, 2005). Existen otras patologías no tumorales relacionadas con la variabilidad de la repetición CAG, más de 40 repeticiones pueden provocar alteraciones neurológicas como la atrofia bulbar espinal, atrofia testicular y defectos de la virilización (Nagashima, Hirose, & al, 1998). Un aspecto importante de destacar es, que poblaciones con alto riesgo de este tipo de cáncer (afro-americanos) presentan repeticiones CAG cortas en mayor frecuencia, mientras que, poblaciones de menor riesgo (asiáticas) se caracterizan por mayor frecuencia de repeticiones largas (Anexo 6) (Edwards, Hammond, Jin, Caskey, & Chakraborty, 1992; Irvine R. , Yu, Ross, & Coetzee, 1995).

Los efectos de la repetición GGC con su secuencia de poliglicina en la actividad transcripcional del AR aun son desconocidos (Platz, y otros, 1998; Ding, Xu, Menon, Reddy, & Barrack, 2005), aunque ha sido relacionado con hipospadia y criptorquidia cuando tiene más de 24 repeticiones debido a la baja afinidad del receptor por los andrógenos. En lo referente al cáncer prostático aun no se define en número de repeticiones de riesgo, pero ciertos estudios relacionan a las repeticiones cortas GGC con el riesgo y progresión (Stanford, Just, & Gibas, Polymorphic repeats in the androgen receptor gene, 1997; Hakimi, Schoenberg, & Rondinelli, 1997), otros han encontrado esta relación en repeticiones largas (Irvine R. , Yu, Ross, & Coetzee, 1995), mientras que la mayoría no ha podido establecer ninguna asociación de riesgo o protección (Cicek, y otros, 2004). En relación a la variación poblacional, esta repetición no ha mostrado ninguna tendencia de frecuencias largas o cortas.

La asociación de riesgo de las repeticiones polimórficas CAG y GGC del gen receptor de andrógenos con el cáncer de la próstata, deben ser comprobadas en cada origen étnico ya que pueden no ser extrapolables (Scaglia, 2008).

Mutaciones dinámicas.-

Entre los primeros resultados del Proyecto Genoma Humano, se encuentra la identificación de las mutaciones dinámicas un tipo particular de mutación, no conocida hasta entonces (Arboleda, 2004). El genoma humano y debido a la gran cantidad de variaciones que presenta, se pueden distinguir dos tipos de mutaciones las estáticas y las dinámicas, en las mutaciones estáticas la tasa de mutación es la misma para la secuencia originada tras la mutación y para la secuencia predecesora. Las mutaciones dinámicas, se presentan en secuencias de ADN repetitivo, caracterizándose por la variación en el número de copias (Peñuelas, de-Miguel, & Gullón, 1997). Estas mutaciones inestables has sido descritas, a partir de 1991, son responsables de un número importante de enfermedades hereditarias del sistema nervioso y multisistémicas (Fu, y otros, 1991; Brooks, y otros, 1997).

La herencia de estas mutaciones es una nueva forma de segregación de las enfermedades hereditarias, las secuencias cambian de tamaño en la línea germinal, aumentan de tamaño volviéndose patológicos a través de las generaciones (Gusella, y otros, 1983). Entre las mutaciones inestables, el tipo más frecuente ocurre cuando tres nucleótidos repetidos en forma sucesiva (tandem) se presentan en una cantidad mayor a la normal en el gen involucrado, produciendo alteración en la función génica, la cual se puede reflejar en anormalidades del metabolismo de los ácidos ribonucleicos, o en la ausencia o producción anormal de la proteína. Como consecuencia de esto se produce una enfermedad, dependiendo del gen afectado (Morrel, 1993; Potaman, y otros, 2003)..

“La cantidad de enfermedades atribuidas a este tipo de mutaciones aumenta conforme avanza las investigaciones sobre el fundamento molecular de las patologías neuro-degenerativas” (Cuenca & Morales, 1999).

Las secuencias inestables que van a dar lugar a las mutaciones dinámicas presentan características propias. Se transmiten en la población general de una generación a otra de forma estable y en las familias portadoras de la mutación (número elevado de repeticiones), la transmisión es inestable de una a otra generación, generalmente incrementando el número de repeticiones. Además, se presenta una relación inversamente proporcional entre el número de repeticiones y la clínica del paciente (Lantigua, 1997).

Factores pronósticos del adenocarcinoma prostático.-

Los factores pronósticos del cáncer prostático, podrían ser definidos como las características de la enfermedad que permiten dar una predicción de su comportamiento en la ausencia de terapia o después de la misma; son muy importantes para interpretar y definir la evolución clínica de cada paciente y categorizarlos en grupos de bajo, mediano o alto riesgo de progresión y duración de la enfermedad (Segarra, Millán, Palou, & Villavicencio, Factores pronósticos y tablas predictivas del cáncer de próstata clínicamente localizado, 2006).

Los factores pronósticos para este tipo de cáncer se dividen en distintas categorías, según sean factores con valor pronóstico posible o demostrado (Pallarés, 2004). (Anexo 3).

Factores pronósticos de categoría I

Estos factores incluyen al estado del tumor, el grado histológico de Gleason, el estado de los márgenes quirúrgicos y la cantidad de PSA preoperatorio.

Estadio Tumoral

Es un predictor, basado en la anatomía del tumor, los clasifica en función de las características del tumor primario (T), la presencia o ausencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales (N) y la presencia o ausencia de metástasis a distancia (M). La clasificación TNM para la estratificación patología de este cáncer es recomendada por la Organización Mundial de la Salud. Esta categorización es un proceso esencial en la atención del paciente oncológico y en la investigación clínica (Lylli, 2011). (Anexo 3)

Grado histológico de Gleason

La puntuación de Gleason es un sistema de gradiente histológico cuantitativo haciendo referencia a la formación glandular, morfología tumoral y al modelo de infiltración de la glándula (< de 4 bien diferenciado, 5-7 moderadamente diferenciado y de 8 a 10 pobremente diferenciado; Los tumores con puntuación Gleason > 6 son agresivos, existiendo una buena correlación con el porcentaje de invasión de los ganglios linfáticos pelvianos, así como con las metástasis a distancia y con la supervivencia pero no con la incidencia del fracaso locorregional (Tannenbaun, 1977; Humphrey, Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate, 2004). (Anexo 4)

Márgenes quirúrgicos

La Organización mundial de la Salud, recomienda que en el informe de rutina se incluya la presencia, localización, y extensión de la infiltración tumoral en todos los márgenes. Esta infiltración afecta de forma significativa a la progresión de la enfermedad, y se correlaciona con tumores de alto grado y poblaciones celulares aneuploides. Además, se ha evidenciado que los casos con márgenes positivos muestran niveles de PSA superiores en el momento del diagnóstico (Pallarés, 2004).

Antígeno prostático Específico (PSA) sérico preoperatorio

El PSA o Antígeno Prostático Específico es una glicoproteína producida exclusivamente por las células epiteliales de la próstata y en pequeñas cantidades por otras glándulas. Normalmente aumenta la movilidad de los espermatozoides y se la asocia con el cáncer de la próstata. La elevación del PSA puede ser debido a una infección, hipertrofia benigna de próstata o traumatismos. Lo más representativo para asociar el nivel de PSA y el cáncer de próstata es observar una elevación de 0.75 ng/ml o mayor en 1 año y niveles superiores a 4,0 ng/ml se considera como patológico. También debe servir para observar la evolución del tratamiento del cáncer de próstata, ya que si el nivel se eleva tras una prostatectomía es indicativo de que persiste tejido maligno o una recurrencia del mismo (Larra, Déniz, Ruíz, Pinar, & Sáez-Bravo, 2004; abcmedico.com, 2012).

Definición de términos básicos

Andrógenos.-

Los andrógenos son hormonas sexuales masculinas y corresponden a la testosterona, la androsterona y la androstendiona. Son hormonas esteroideas derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno, cuya función principal es la de estimular el desarrollo de los caracteres sexuales masculinos (Dearnley, 1994).

Receptor hormonal.-

Los receptores hormonales son macromoléculas o asociaciones macromoleculares a las cuales la hormona se fija selectivamente en virtud de una estrecha adaptación conformacional o complementariedad estructural. Al unirse la hormona correspondiente, induce en ellos un cambio

conformacional iniciándose los eventos determinantes del efecto final. Los receptores hormonales se encuentran situados en la superficie de las células o en el interior de las mismas. Todos o casi todos los receptores hormonales son proteínas, además, cada receptor suele ser específico para una única hormona; ello determina qué hormona actuará sobre un tejido particular (Devlin, 1999)

Hiperplasia.-

Excesiva multiplicación de células normales en un órgano o tejido. Aumento del volumen de un órgano o tejido debido a la multiplicación anómala de las células que lo componen, siempre que no sea de origen tumoral. (Muñoz, Genes y nuevas Terapias, 1997)

Adenocarcinoma.-

Tumor maligno compuesto por células epiteliales procedentes de las glándulas (Denmeade & Isaacs, 2004)

Polimorfismo.-

Locus genético que está presente en dos o más alelos distintos, de forma con una frecuencia mayor o igual a 1% en la población general. Un polimorfismo puede ser transitorio (las frecuencias alélicas tienden a cambiar debido a una ventaja selectiva) o estable (las frecuencias alélicas permanecen constantes durante muchas generaciones). (Binnie, Freda, Heald, & Fouad, 2005)

Trinucleótido-

Combinación de tres unidades de nucleótidos adyacentes utilizadas para identificar un aminoácido en un genoma. (Lewin, 2001)

Exón.-

Región de la secuencia codificante de un gen que se traduce a una proteína (a diferencia de los intrones, que no se traducen). La denominación procede del hecho de que los exones son las únicas partes de un transcrito de RNA que se observan fuera del núcleo (Lewin, 2001).

Actividad transcripcional.-

Proceso de copia de la secuencia del DNA que codifica una proteína, como una secuencia de bases de RNA (Watson, y otros, 1994).

Glutamina.-

(Gln o Q) Uno de los 20 aminoácidos más comunes; es una cadena lateral de una amida del ácido glutámico, formada mediante el reemplazo del hidroxilo del ácido glutámico con un grupo funcional amina. Está codificada en el ARN mensajero como 'CAA' o 'CAG'. Es el aminoácido más abundante en los músculos y está muy relacionado con el metabolismo que se realiza en el cerebro. (Dearnley, 1994) .

Poliglicina.-

(Gly, G) Denominada también glicocola es el aminoácido más pequeño y el único no quiral de los 20 aminoácidos codificada como GGT, GGC, GGA o GGG, su fórmula química es $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ y su masa es 75,07. Actúa como neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central. (Dearnley, 1994)

Mutación.-

Las mutaciones comprenden casi todo cambio concebible de la secuencia del ADN, resultado de los errores de la duplicación y daños a esta molécula, constituye un cambio permanente que puede alterar la secuencia codificadora de un gen o sus secuencias reguladoras. El efecto de las mutaciones por lo general solo se manifiesta en la progenie de la célula en la que se produjo la alteración de la secuencia, pero las lesiones que impiden la duplicación o la transcripción pueden tener efectos inmediatos sobre la función y supervivencia celular. (Watson, y otros, 1994)

Fundamentación legal

Constitución Política de la Republica del Ecuador

La Constitución Política de Ecuador recoge los lineamientos generales que reglamentan el control y uso de los recursos genéticos en la República del Ecuador. Dentro del título III: De los derechos Garantías y deberes; Capítulo 5: De los derechos colectivos; sección segunda: Del medio Ambiente, se estipula en el artículo 86, textualmente:

Se declaran de interés público y se regulan conforme a la ley:

1. “La preservación del medio ambiente, la conservación de los ecosistemas, la biodiversidad y la integridad del patrimonio genético del país”.

De la ciencia y tecnología en salud

Art. 29.-El Ministerio de Salud Pública, con el apoyo del Consejo Nacional de Salud y la participación de la CENACYT, impulsará una política de investigación orientada a las prioridades nacionales y al desarrollo y transferencia de tecnologías adaptadas a la realidad del país manteniendo el enfoque pluricultural que incluye la promoción y desarrollo de la medicina tradicional y alternativa.

Evaluará y racionalizará el uso de los recursos tecnológicos para su optimización nacional y promoverá el intercambio científico y tecnológico entre las instituciones del sector.

Segunda.- A partir de la vigencia de la presente Ley, el Consejo Nacional de Salud que se crea, subroga los derechos y obligaciones contraídos legalmente por el Consejo Nacional de Salud creado mediante Decreto Ejecutivo No. 56, publicado en el Registro Oficial No. 124 de 8 de febrero de 1980, sustituido por Decreto 3658 En ejercicio de 20 de enero de 1988, publicado en el Registro Oficial No. 861 de enero 27 de 1988.

Art. Final.- La presente Ley Orgánica del Sistema Nacional de Salud entrará en vigencia a partir de su publicación en el Registro Oficial.

Decisión 391, Régimen Común de Acceso a Recursos Genéticos

En la República de Ecuador el acceso a los recursos genéticos está regulado por la política y

Estrategia nacional de Biodiversidad del Ecuador y contempla los siguientes objetivos:

Asegurar la existencia, integridad y funcionalidad de los componentes de la biodiversidad ecosistemas especies y genes”

De lo anotado, se destaca que el presente estudio se rige a estos artículos, en lo referente al manejo y estudio de muestras biológicas, pues estas constituyen parte del patrimonio genético de la Republica del Ecuador.

Hipótesis

Dado que la actividad transcripcional del gen Receptor de Andr6genos esta inversamente relacionada con el tama1o de la repetici3n CAG, la hip3tesis planteada relaciona los rangos mas cortos de este trinucle3tido con el riesgo y etapas m1s agresivas del c1ncer prost1tico.

En relaci3n a la repetici3n GGC aun no se define rol dentro del proceso transcripcional del gen receptor de andr6genos. Por lo que se evalu3 como alelos de riesgo a las repeticiones menores y mayores al promedio establecido en otras publicaciones.

La literatura reporta como alelos de riesgo a los rangos de ≤ 21 CAG y ≤ 17 GGC por lo que la hip3tesis descriptiva para relacionar la variable CAG-GGC y c1ncer prost1tico fue:

Ho: No existe relaci3n de los alelos ≤ 21 CAG + ≤ 16 GGC o ≤ 21 CAG+ ≥ 17 GGC, con el diagn3stico y etapa del adenocarcinoma prost1tico

Ha: Si existe relaci3n entre los individuos que presenten repeticiones ≤ 21 CAG + ≤ 16 GGC o ≤ 21 CAG+ ≥ 17 GGC con el riesgo de desarrollar c1ncer prost1tico y entre m1s peque1os sean estos rangos, se relacionan con etapas mas agresivas del tumor .

Variables de Investigaci3n

Variables independientes:

Repetición AR CAG.

Repetición AR GGC.

Variable dependiente:

Adenocarcinoma Prostático.-

Conceptualización de Variables.-

Repetición AR CAG.-

Repetición de longitud polimórfica Citosina Adenina Guanina del exón 1 del Gen Receptor de Andrógenos.- Secuencia del aminoácido glutamida que conforma un tracto de poliglutamida.

Repetición AR GGC.-

Repetición de longitud polimórfica Guanina Guanina Citosina del exón 1 del Gen Receptor de Andrógenos.- Secuencia del aminoácido glicina que conforma un tracto de poliglicina.

Variable dependiente:

Adenocarcinoma Prostático.-

El Adenocarcinoma es un carcinoma o cáncer que tiene su origen en células que constituyen el revestimiento interno de las glándulas de secreción externa; por lo tanto es un tipo cáncer originado en la próstata, órgano glandular del sistema reproductor masculino.

Variables clínico patológicas del Adenocarcinoma Prostático.-

Características estructurales y funcionales que adquiere el tejido prostático como consecuencia del cáncer.

CAPITULO III

METODOLOGÍA

Diseño de la investigación

En el presente análisis se busca determinar rangos de repetición en dos secuencias polimórficas del gen Receptor de Andrógenos, posiblemente asociadas al riesgo de cáncer prostático en tres grupos poblacionales del Ecuador.

El enfoque cuanti-cualitativo de esta investigación por un lado, se orienta al área de la Epidemiología, constituyendo un estudio de caso control, en donde se identifica a individuos con una variable de interés (Cáncer prostático) y se comparan con un grupo control que no presente dicha variable, para este fin se analizaron molecularmente las secuencias nucleotídicas de las repeticiones CAG y GGC de Exón 1 del Gen Receptor de Andrógenos en piezas tumorales prostáticas, y en individuos sanos que conforman la población control, ambos grupos pertenecientes al grupo étnico Mestizo. Y, por otro lado, constituye un estudio descriptivo, donde se caracterizó estas dos repeticiones polimórficas en individuos sanos pertenecientes a la etnia Indígena, al no existir registros de cáncer prostático en Ecuador para este grupo poblacional, se los excluye del análisis de caso control.

La modalidad de trabajo de grado en este estudio, corresponde a un proyecto de áreas de formación profesional, constituye una investigación de tipo exploratoria cuyo fin es determinar rangos o tamaños de las repeticiones CAG y GGC asociadas al riesgo de cáncer prostático en la población mestiza ecuatoriana, además, el caracterizar molecularmente este tipo de secuencias en la poblaciones indígenas del Ecuador, es de gran importancia en la comprensión de la etiología del cáncer de la próstata en relación a la variación étnica.

En la fase de campo de esta investigación se colectaron muestras de Adenocarcinoma prostático de los tres principales centros médicos que albergan piezas tumorales provenientes de todo el Ecuador, la población control corresponde a muestras sanguíneas de voluntarios sanos complementarios a las características de la población afecta, y las muestras de la población indígena corresponden a raspados bucales realizados a lo largo de la región sierra.

La fase de laboratorio comprendió el procesamiento y análisis de muestras en los tres grupos de estudio, mediante técnicas de biología molecular: Extracción, purificación y cuantificación de

ADN, Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), purificación y cuantificación del producto de PCR, reacción de secuenciación, purificación de reacción de secuenciación y secuenciación de ADN. Obtenidos los genotipos de cada muestra se realizó el análisis estadístico correlacionando los rangos de repetición CAG y GGC con los datos clínicos.

Población y muestra

La población total de estudio consistió de 334 individuos ecuatorianos, mayores de edad y de sexo masculino, de estos, 108 individuos mestizos diagnosticados de adenocarcinoma prostático conformaron el grupo de afectos, 135 individuos mestizos sanos fueron empleados como grupo control y 78 individuos sanos categorizados como indígenas conformaron el grupo para el análisis molecular de poblaciones nativas.

Las muestras que se incluyó y categorizó en este estudio estuvieron respaldadas por sus respectivos consentimientos informados (Anexo 7).

Operacionalización de Variables

Cuadro 1.- Operacionalización de variables

	Variables		Dimensión	Indicadores
Independientes	Repetición CAG	Cuanti-cualitativo	Número de Trinucleótidos	≤ 21 CAG ≥ 22 CAG
	Repetición GGC		Número de Trinucleótidos	≤ 16 GGC ≥ 17 GGC
Dependiente	Adenocarcinoma Prostático	Cualitativo	Diagnóstico Oncológico	Grado de Gleason
				Estadio tumoral
				Invasión V.Seminales
				Márgenes Quirúrgicos
				PSA

Técnicas e instrumentos para la recolección de datos

Obtención de muestras

Las muestras que conformaron la población afecta se colectaron a partir de piezas tumorales de individuos mayores de 46 años con previo diagnóstico de Adenocarcinoma prostático clínicamente localizado, estos individuos fueron tratados con prostatectomía radical y determinadas secciones tumorales fueron fijadas en formalina y embebidas en parafina.

Estas muestras tumorales fueron obtenidas de los servicios de patología, de dos centros médicos de la ciudad de Quito, el Hospital Carlos Andrade Marín (HCAM) y Hospital Oncológico Solón Espinoza Ayala (SOLCA), además del Dispensario del Instituto Ecuatoriano de Seguridad Social de la ciudad de Loja. Las muestras de estos tres centros médicos correspondieron a individuos provenientes de 19 provincias a nivel nacional y diagnosticado durante el periodo 2004-2006. La información correspondiente a las historias clínicas contenían los siguientes datos: Diagnóstico clínico, edad, antecedentes patológicos personales, antecedentes patológicos familiares, nivel preoperatorio del antígeno prostático específico al momento del diagnóstico (PSA) en ng/ml, grado Gleason, estadio Tumor, Nódulos, Metástasis (TNM), invasión a vesículas seminales, margen quirúrgico positivo, entre otros. De esta información se tomaron cinco variables clínico-patológicas para ser relacionadas con las secuencias de estudio.

Las muestras del grupo control se colectaron a partir de un mililitro de sangre periférica de individuos mayores de 40 años, mediante punción venosa y tubos con EDTA (ácido etilendiamintetracético) como anticoagulante. Estas muestras fueron obtenidas de: Casa de Reposo Sara Espíndola de la ciudad de Tulcán, Iglesia de Cristo Internacional de la ciudad de Quito, Hospital Regional Docente de Ambato y de la Universidad Técnica particular de Loja, los lugares de origen de los individuos control pertenecían a 20 provincias a nivel nacional durante el periodo 2006-2007.

Los individuos considerados como el grupo control no registraron antecedentes personales o familiares de ningún tipo de cáncer, sin exposición prolongada a agentes genotóxicos, y nulo o reducido consumo de bebidas alcohólicas, cigarrillos y sustancias ilegales. Además completaron una encuesta biomédica que incluyó datos como: edad, origen étnico, procedencia, ocupación, antecedentes patológicos personales y familiares, hábitos de consumo de licor, cigarrillo u otras sustancias, entre otros. (Anexo 8)

Para la caracterización molecular de poblaciones nativas del Ecuador, se colectaron muestras de células epiteliales, de individuos mayores de edad auto reconocidos como indígenas, mediante frotis con swabs de la cara interna de la mejilla. Estas muestras se recolectaron a lo largo de la región andina ecuatoriana, en 9 comunidades indígenas pertenecientes a 6 provincias y correspondientes a los

pueblos y nacionalidades: Cañarí, Otavalo, Pasto, Karanki, Kiwchua y Wuarango. También completaron la encuesta aplicada a la población control.

Análisis y procesamiento de muestras

Técnicas moleculares

Extracción y purificación del ADN

El ADN puede ser aislado a partir de cualquier material de origen biológico, se encuentra en el interior del núcleo de todas las células, disperso y muy replegado, unido a proteínas para formar la cromatina. Por lo que es necesario romper las células para separarlo del núcleo y de las proteínas, y finalmente es precipitado en una solución acuosa.

La extracción del ADN se realizó mediante la modificación de protocolos estandarizados (Chan, 1992; Manak, 1993; Ausubel, y otros, 1995; Promega Corporation, 1999; Paz-y-Miño & Leone, Técnicas utilizadas en el análisis de mutagenicidad y carcinogénesis, 2002; invitrogen, 2007). Los protocolos empleados dependieron de las muestras a analizar; para la extracción de ADN a partir de piezas tumorales embebidas en parafina se utilizó el protocolo de Manak. (1993); para las muestras de sangre periférica se aplicó el protocolo de Chan. (1992) en volúmenes de 3-5ml y para volúmenes menores a 1 ml se aplicó el kit de extracción WIZAR® de Promega Corporation. (1999); en la extracción de ADN a partir de muestras de raspado bucal provenientes de poblaciones indígenas se aplicó los protocolos de PureLink™ Genomic DNA Kits de invitrogen. (2007).

Para muestras de ADN degradado o en presencia de proteínas u otras impurezas, se utilizó el método de purificación fenol-cloroformo-álcool isoamílico, en relación de volumen 1:1, obteniendo un ADN de peso molecular no elevado pero sí de mejor calidad.

Extracción de ADN a partir de piezas tumorales embebidas en parafina.-

- Se determinó de forma precisa el área con presencia de cáncer en cada bloque de parafina, mediante la técnica de visualización directa en un microscopio de luz (Zhuang, Merino, Chuaqui, Liotta, & Emmert-Buck, 1995).

- Mediante un una hoja de bisturí estéril No. 5. Se realizo un microcorte del área seleccionada de aproximadamente 10 mm a 1 cm.
- Se retiró la mayor cantidad posible de parafina al fragmento de muestra aislado y se lo trituro con un mortero.
- La muestra triturada fue colocada en un eppendorf de 1.5 ml, añadiendo xilol hasta 1.5 ml, para remover la parafina.
- Se mezcló por inversión a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- Posteriormente, se centrifugó por 5 minutos a 10.000 rpm.
- Se removió y desechó el xylol con una pipeta Pasteur.
- Se añadió nuevamente xylol hasta 1.5 ml y se repitieron los pasos subsiguientes.
- Se agregó 0.5 ml de etanol al 100% y se mezcló por inversión para remover xylol.
- Se centrifugó durante 5 minutos a 10000 rpm, y posteriormente se removió y desechó el etanol con una pipeta Pasteur.
- Se repitieron los dos últimos pasos tratando de sacar lo máximo posible de etanol.
- Se tapó los tubos con parafilm y se les hizo agujeros, dejándolos secar por 3 horas a 37°C.
- Una vez secos, se agregó de 150 a 500 µl de solución de digestión de proteínas (NaCl 5M; EDTA 0.25M; SDS 10%; proteinasa K 0.2 mg/ml) dependiendo de la cantidad de muestra.
- Se incubó a 45oC durante dos a tres noches hasta que se disolvió el pellet.
- Se llevaron los tubos a 95oC durante 10 minutos (para inactivar la proteinasa K)
- Se centrifugó por 5 minutos a 10000 rpm a temperatura ambiente.
- Se añadió un volumen de cloroformo – alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 rpm a 4°C.
- Se retiró el sobrenadante y se lo colocó en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml, añadiendo 8µl de NaCl 5 M por cada 100 µl de fase acuosa.
- Se agregó etanol absoluto, el doble volumen de la fase acuosa, y se invirtió suavemente el tubo hasta ver la medusa de ADN.
- Cuando no se observó medusa (ADN degradado), se dejó a los tubos a -20°C durante 48 horas.
- Se centrifugó durante 10 minutos a 10.000 rpm a 4°C. Se decantó el etanol.
- Luego, se añadió 500 µl de etanol al 70% a -20°C y se centrifugó con las condiciones anteriores, se decantó el etanol y se le dejó secar completamente.
- Se agregó 150 µl de agua Mili-Q para resuspender el ADN, conservándolo a -20°C.

Extracción de ADN a partir de muestras de sangre periférica 3-5ml (Extracción con sales)

- Las muestras de 3 a 5 ml de sangre periférica, se colocaron en unos tubos cónicos de 15 ml y se centrifugaron durante 10 minutos a 4000 revoluciones por minuto (rpm) a 4°C, eliminando el suero utilizando una pipeta Pasteur.
- Añadiendo suero fisiológico estéril hasta 12ml, se resuspendió el pellet y se centrifugó 10 minutos a 4000 rpm a 4°C. Se retiró y descartó el suero (sobrenadante) con una pipeta Pasteur.
- Se agregó el tampón de lisis de eritrocitos (Tris 0.02M; MgCl₂ 0.005M) hasta completar 12 ml, se agitó durante cinco minutos y se centrifugó por 12 minutos a 4000 rpm a 4°C. Se retiró el sobrenadante con pipeta Pasteur.
- Nuevamente, se agregó tampón de lisis de eritrocitos hasta llegar a 6 ml, se agitó hasta resuspender el pellet y se centrifugó por 12 minutos a 4000 rpm a 4°C. Se eliminó el sobrenadante con pipeta Pasteur.
- Se añadió agua destilada estéril hasta llegar a 10 ml, se agitó hasta que el pellet se rompió y se centrifugó durante 12 minutos a 4000 rpm a una temperatura de 4°C. El sobrenadante fue decantado en forma directa.
- Se colocaron 5 ml de tampón de lisis de leucocitos (Tris 0.01 M; NaCl 0.4 M; EDTA 0.002 M), 333 µl de Lauril-Sulfato al 10% y 700 µl de solución de proteinasa K (proteínasa K 2 mg/ml; SDS 1%; EDTA 0.002 M). Esto se incubó toda la noche a 45°C hasta la disolución total del botón celular.
- Una vez que el botón estuvo disuelto, se añadió 1.66 ml de NaCl 6M, se agitó durante 5 minutos. Se centrifugó la muestra durante 35 minutos a 4000 rpm a 20°C.
- El sobrenadante se trasladó a un tubo cónico nuevo y se añadieron dos volúmenes de etanol absoluto a -20°C. Se invirtió el tubo suavemente varias veces hasta la aparición de la medusa de ADN.
- Se transfirió la medusa de ADN a un eppendorf de 1.5 ml con 500 µl de etanol al 70% a -20°C
- Se centrifugó durante 5 minutos a 10.000 rpm a 20°C. Se decantó el etanol de forma directa.
- Se añadió nuevamente 500 µl de etanol al 70% a -20°C y se centrifugó la muestra siguiendo las mismas condiciones que en el paso anterior. Se decantó el etanol y se lo dejó evaporar durante 2-3 horas a temperatura ambiente o durante 30-60 minutos a 37°C hasta que la medusa de ADN estuviera bien seca.
- La medusa de ADN fue resuspendida en 300 µl de agua bidestilada (Mili-Q) y conservada a -20°C.

Extracción de ADN a partir de muestras de sangre periférica, hasta 1ml (Wizard® Genomic DNA Purification Kit)

- En un eppendorf de 1.5 ml se añadieron 900 µl de solución de lisis celular y 300 µl de sangre. homogenizando completamente.
- Para lisar a los eritrocitos, se incubó el tubo por 10 minutos a temperatura ambiente, durante la incubación se lo invirtió 2 a 3 veces.
- Se centrifugó la muestra durante 2 minutos a 14.000 rpm a temperatura ambiente.
- Se retiró y desechó el sobrenadante tratando de no revolver el pellet.
- Si en la muestra de sangre aun se observaban partículas de hemoglobina, se repetían todos los pasos anteriores hasta quedar el pellet blanco.
- El tubo fue mezclado en un vórtex
- Se añadió 300 µl de solución de lisis nuclear y se pipeteó la solución 5 a 6 veces para romper los leucocitos. Si después de mezclar se observaban aglutinaciones de células, se incubó la solución a 37°C, hasta que éstas se disolvieron. En el caso de no disolverse en el transcurso de una hora, se añadió 100 µl de solución de lisis nuclear y se repitió la incubación.
- A este lisado nuclear, se le añadió 1.5 µl de solución RNAsa y se lo mezcló invirtiendo el tubo 2 a 5 veces. Se incubó la mezcla a 37°C por 15 minutos.
- Se añadió 100 µl de solución de precipitación de proteínas y se mezcló en el vórtex por 15 segundos.
- Se centrifugó durante 3 minutos a 14.000 rpm a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 ml, que conteniendo 500 µl de isopropanol.
- Se mezcló suavemente la solución por inversión hasta que la medusa de ADN fuera visible.
- Se centrifugó durante 2 minutos a 14.000 rpm a temperatura ambiente.
- Se decantó el sobrenadante y se añadió un volumen de etanol al 70% a temperatura ambiente. Se invirtió el tubo varias veces para lavar el pellet de ADN y se centrifugó como el paso anterior.
- Se retiró cuidadosamente el etanol y se dejó secar el tubo por 10 a 15 minutos.
- Se añadió 100 µl de solución de rehidratación de ADN y se lo incubó a 65°C por 1 hora o se lo dejó toda la noche a 4°C.
- El ADN se conservó a 4°C o a -20°C.

Extracción de ADN a partir de muestras de raspado bucal (PureLink™ Genomic)

- En un eppendorf de 1.5 ml conteniendo el swab, 500ul de solución de OralGene®, buffer de conservación o PBS se añadió 20ul de Proteinasa K y se mezcló bien por vórtex.
- Se agregó un volumen igual al inicial de PureLink™ Genomic Lisis / Binding Buffer y nuevamente se mezcló por vórtex.
- La mezcla se incubó a 55°C durante 10 minutos.
- Se centrifugó brevemente y se depositó todo el lisado en los tubos caps conteniendo 200ul de etanos al 100%.
- La solución fue homogeneizada mediante 10 segundos en vórtex y posteriormente depositada en las columnas Spin con su respectivo tubo colector.
- Se centrifugó a 10000 x g durante un minuto a temperatura ambiente.
- Se desechó el tubo colector conteniendo la solución del primer lavado y fue reemplazado por un nuevo tubo.
- Se añadió 500ul de Wash Buffer 1 y se centrifugó a 10000 x g durante un minuto.
- Nuevamente se desechó el tubo colector conteniendo la solución del segundo lavado y fue reemplazado por uno nuevo.
- Se añadió 500ul de Wash Buffer 2 y se centrifugó a máxima velocidad durante 3 minutos, descartando nuevamente el tubo colector.
- A la columna spin se le añadió de 25 a 200ul de Elution Buffer (dependiendo de la concentración y volumen q se requieran) y fue colocada en un eppendorf de 1,5ml.
- La columna fue incubada por un minuto a temperatura ambiente y posteriormente centrifugada a máxima velocidad durante dos minutos.
- La columna spin fue descartada, ya que el ADN se depositó en el eppendorf.
- El ADN aislado fue almacenado a 4 o -20°C.

Purificación del ADN

- Por cada solución de 200 µl de del ADN extraído, se añadió 1 volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló por inversión.

- Se centrifugó por 15 minutos a 12.000 rpm. Obteniendo tres fases, la superior o sobrenadante donde estaba el ADN, la fase intermedia de nata de proteínas y la fase inferior con el fenol y cloroformo.
- Se lo trasladó el sobrenadante a otro eppendorf y se añadió 1 volumen de cloroformo, mezclando nuevamente por inversión
- Se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 minutos.
- Se trasladó el sobrenadante a otro eppendorf y se añadió un volumen de isopropanol a -20°C.
- Se mezcló suavemente por inversión y se dejó precipitar a -20°C por 48 horas.
- Se centrifugó por 15 minutos a 12.000 rpm. Se obtuvo un sobrenadante que era el alcohol y un precipitado que era el ADN.
- Se decantó el sobrenadante y al precipitado se le añadió 500 µl de etanol al 70% a -20°C.
- Se centrifugó 5 minutos a 12.000 rpm. Se decantó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado hasta que el etanol volatilizó.
- Se disolvió el ADN en 100 µl de agua (Milli-Q) y se almaceno a 4°C o a -20°C.

Análisis cualitativo y cuantitativo del ADN extraído.-

La determinación de la calidad y cantidad del ADN se la realizó mediante geles de agarosa al 1% y una concentración de 10 mg/ml de bromuro de etidio. Las condiciones de electroforesis horizontal a las que fueron sometidos los geles fueron: Una carga constante de 70 voltios durante aproximadamente 50 minutos sumergidos un tampón de Tris-Borato-EDTA (TBE, 1X) como campo eléctrico.

En una lámpara de luz ultravioleta se compararon la fluorescencia emitida por el bromuro de etidio ligado a los nucleótidos de las muestras de ADN y la emitida por un marcador de alto peso molecular (Low Mass® DNA ladder de Invitrogen) que contiene fragmentos de ADN de tamaño y concentraciones determinadas. La concentración fue estimada mediante la reacción de intensidad del bromuro, y la calidad se valoró mediante el patrón y reacción de intensidad electroforética. Las muestras que reunieron todas las características atribuidas a muestras de buena calidad fueron sometidas a la siguiente fase de la metodología.

Amplificación del DNA mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).-

La PCR es un método rápido de amplificación *in vitro* de secuencias de ADN específicas dentro de una muestra, permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo. Se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos de altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas (Newton & Graham, 1994; Izquierdo, 1999). Esta técnica consiste de tres etapas:

Desnaturalización: En esta primera etapa el ADN molde es incubado a alta temperatura entre 92°-94°C, para separar las cadenas complementarias rompiendo las uniones de hidrógeno, y así, permitir el apareamiento con el iniciador específico.

Hibridación o “annealing”: La mezcla de reacción es enfriada a una temperatura media de 37-60 °C y con condiciones salinas específicas permite la unión del cebador o primer específico a las secuencias complementarias.

Extensión: A una temperatura entre 70°C – 80°C, la DNA polimerasa copia el ADN entre las secuencias correspondientes a los oligonucleótidos iniciadores (Torres & Baca, 1995).

Componentes de la reacción

- La DNA polimerasa (Taq DNA polimerasa, la más utilizada), es una enzima que cataliza la síntesis de largas cadenas de polinucleótidos, usando una de las cadenas parentales de DNA originales como molde para la síntesis de una nueva cadena complementaria, esta enzima es purificada a partir de las bacterias *Thermus aquaticus* y su tasa de incorporación de nucleótidos, K_{cat} , es de unos 150 nucleótidos/seg./enzima.
- El Material Genómico o ADN (Ácido desoxiribonucleico) en este estudio alcanzó una concentración entre 50 y 150 ng.
- Los oligonucleótidos, cebadores o primers, están diseñados para que puedan iniciar la reacción de síntesis de ADN en presencia de una DNA polimerasa, habitualmente de 15 a 30 nucleótidos de longitud, complementarios de los extremos 3' de la secuencia diana. Los primers utilizados fueron:

Cuadro 2.- Secuencia de cebadores para PCR

GEN	PRIMER	SECUENCIA	Tamaño aproximado (pb)
AR	AR-CAG	5'-TCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGC-3' 5'-GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCCTCAT-3'	288
AR	AR-GGC-1	5'-TCCTGGCACACTCTCTTCAC-3' 5'-GCCAGGGTACCACACATCAGGT-3'	250
AR	AR-GGC-2	5'-ACTCTCTTCACAG-CCGAAGAAGGC-3' 5'-ATCAGGTGCGGTGAAGTCGCTTTCC-3'	198

(pb), pares de bases

- Los cuatro desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) que son: dATP, dCTP, dGTP y dTTP
- El Buffer es una solución que sirve para mantener constante un pH.
- Estas reacciones se llevaron a cabo en un termociclador PT-100 Peltier Thermal Cycler, que es un instrumento automatizado encargado de cambiar las temperaturas necesarias para completar la reacción enzimática.

Amplificación de la repetición CAG

Las condiciones de la PCR aplicadas para la amplificación de esta región, fueron modificadas a partir de protocolos de Irvine. (1995) y Hakimi. (1997). El volumen final de reacción fue de 50ul conteniendo: 50-100ng de ADN; 20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 50 mM KCL; 3mM de MgCl₂; 200uM de cada dideoxinucleótido trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 40nM de cada uno de los cebadores, 0,5 unidades de Taq ADN polimerasa (invitrogen) y 0,0008mmol/L de DMSO.

Cuadro 3. Programa del Termociclador utilizado para amplificación de la repetición CAG

Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
1	95	5:00

2	95	0:45
3	61	0:30
4	72	0:30
5	desde 2	32 ciclos
6	72	5:00

Amplificación de la repetición GGC

Las condiciones de la PCR aplicadas para la amplificación de la repetición GGC, se basaron en modificaciones a partir de protocolos de Hakimi. (1997) y Chang.(2002). El volumen final de reacción fue de 50ul conteniendo: 50-100ng de ADN; 20 mM Tris-HCl (pH 8,4); 10 mM KCL; 3mM de MgCl₂; 0,2 mM de dATP y dTTP; 0,3 mM de dCTP y dGTP; 100nM de cada primer; 1,5 unidades de Taq ADN polimerasa (invitrogen) y 0,001mmol/L de DMSO.

Cuadro 4. Programa del termociclador utilizado para amplificación de la repetición GGC1

Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
1	95	6:00
2	96	0:45
3	59	0:30
4	72	0:45
5	desde 2	30 ciclos
6	72	10:00

Cuadro 5.- Concentraciones de reactivos PCR, para amplificación de la repetición GGC 2.

Para esta reacción se utilizó 2 ul de la anterior amplificación y se utilizó el kit **Accu Prime™ GC-Rich DNA Polymerase** de invitrogen, en un volumen final de 25ul.

Reactivo	Concentración	Volumen X 1
-----------------	----------------------	--------------------

	inicial	ul
H2O		16,7
Fw	10 μ M	0,4
Rw	10 μ M	0,4
5 X Buffer A	1x	5
Polimerasa AccuPrime™	2U/ul	0.5
ADN	-	2
Volumen total	--	25

Cuadro 6. Programa de PCR utilizado para amplificación de la repetición GGC2

Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
1	95	2:00
2	95	0:30
3	59	0:30
4	72	0:45
5	desde 2	28 ciclos
6	72	5:00

Verificación del amplificado en electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 2%.-

La verificación de los productos amplificados por PCR se la realizo por electroforesis vertical en geles de agarosa al 2%, preparados con bromuro de etidio y sumergidos en solución de buffer TBE 1X. La electroforesis se realizó a 60 voltios durante 2 horas y posteriormente se observo el gel en luz ultravioleta.

Purificación de productos de PCR.-

Previo a la secuenciación de las reacciones de PCR y para obtener secuencias legibles es necesario la purificación de las misma, en este paso se utilizó el kit comercial: PureLink™ PCR Purification Kit (Invitrogen)

- Se añadió 4 volúmenes de solución de fijación (PureLink Binding Buffer) por cada volumen de producto de PCR mezclado por vórtex.
- Esta mezcla fue depositada en los tubos de filtrado dentro de los tubos de colección, centrifugando a 10.000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente.
- Se descartó el precipitado y se añadió 400 ul de solución de lavado (PureLink Wash Buffer) y se centrifugó a 10.000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugación a 14.000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente para eliminar restos de la solución de lavado.
- El tubo de colección fue descartado y se colocó el tubo de filtrado dentro de un tubo eppendorf de 1,7 ml.
- Se añadió 25 ul de solución de dilución (PureLink Elution Buffer) en el centro de la columna del tubo de filtrado y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifugó los tubos a máxima velocidad durante 4 minutos a temperatura ambiente.
- Se descartó el tubo de filtrado y el producto purificado fue almacenado a 4 o -20°C.

Secuenciación de las regiones amplificadas.-

A diferencia de las anteriores reacciones de PCR, en la reacción de secuenciación la DNA polimerasa integra desoxinucleótidos y dideoxinucleótidos, en este último caso la reacción se detiene generando un oligonucleótido al azar con un ddNTP marcado. El volumen final de la reacción fue de 15ul mediante la aplicación del kit Bid Dye Terminator® en las siguientes proporciones:

Cuadro 7.Reacción de secuenciación con Bid Dye Terminator®

Reactivo	Concentración inicial	Volumen X 1 (ul)
-----------------	------------------------------	-------------------------

Bid Dye Terminator®	2,5X	2
Buffer BDT	5X	1.2
Primers	1pmol/ul	3
ADN	5-11ng	1
H2O		7.8

Cuadro 8. Programa de PCR utilizado para amplificación de la repetición GGC1

Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)
1	95	1:00
2	95	0:18
3	55	0:13
4	60	4:00
5	desde 2	25 ciclos

Purificación de la reacción de secuenciación mediante Big Dye X-Terminator Purification Kit

- Los pasos a partir de la adición de los marcadores se realizaron evitando la exposición prologada a la luz
- En tubos de reacción de 100 ul se coloco 10ul del producto de amplificación marcado, 45ul de de reactivo SAM y 10ul de reactivo BDTX.
- Se mezclo vigorosamente en vórtex durante 30 minutos y centrifugó a 1000g durante 2 minutos.
- Se corrió las muestras en el analizador genético 3130 con el modulo de corrida Bid Dye Terminator.
- El análisis genético de las muestras se realizó en un equipo 3130 de Applied Biosystems con polímero POP7, capilar de 36mm y programa de corrido recomendados para secuencias de este tamaño.

Validez y Confiabilidad de los instrumentos

Para definir los parámetros epidemiológicos en la historias clínicas de las muestras afectas, los servicios de patología que proporcionaron las muestras se basaron en criterios propuestos por Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IACR), parámetros como Grado de Gleason, Estadio Tumoral, PSA, Metástasis, entre otros, están incluidos en protocolos de diagnóstico oncológico válidos a nivel mundial.

La selección, categorización y número de muestras, se determinaron en base de publicaciones internacionales relacionadas al tema y recomendaciones de expertos en las áreas de Genética, Oncología y Patología.

La encuesta biomédica, el consentimiento informado y el protocolo de obtención de muestras, se respalda en principios y métodos epidemiológicos del cáncer, ha sido validada por los respectivos comités de Bioética de la Universidad de las Américas, Pontificia Universidad Católica del Ecuador y la Secretaria Nacional para la ciencia y tecnología (SENACYT) como una investigación anexa al proyecto: ESTUDIO DE GENES INVOLUCRADOS EN EL ORIGEN EVOLUCION Y PROGRESION DE TUMORES SOLIDOS código de registro: (SENACYT)-PUCE-PIC-015

Las técnicas moleculares utilizadas, como: extracción de ADN, PCR, secuenciación, etc. constituyen protocolos de investigación estandarizados y aplicados por distintos laboratorios de biología molecular y genética de los principales centros de investigación científica a nivel mundial, por lo que son meritoriamente válidos y confiables.

El procesamiento de datos, así como la verificación de hipótesis se realizó mediante equipos y programas informáticos de la más alta tecnología, todos los resultados obtenidos se han sometido a un control de calidad, por lo que constituyen instrumentos automáticos que se respaldan en softwares de análisis específicamente desarrollados para este tipo de estudios.

Técnicas para el Procesamiento de Datos y Verificación de Hipótesis

Secuenciamiento e Identificación de genotipos

Las muestras de ADN fueron preparadas de acuerdo a los protocolos Big Dye Terminator descritos previamente, y sometidas al proceso de secuenciación o análisis de secuencias en un Analizador Genético 3130 de Applied Biosystems, equipo totalmente automatizado, de detección del marcaje de ADN con fluorocromos y electroforesis capilar. La evaluación de asignación de bases y la identificación de genotipos se realizó utilizando el software Sequencing Analysis™ V 5.2, donde todas las secuencias aprobaron el control de calidad requerido.

Confirmación y Análisis de secuencias

Una vez obtenidas las secuencias y confirmada la asignación de bases en cada muestra, se realizó el ensamblaje, alineamiento y comparación para la detección de variantes mediante la aplicación del software SeqScape™, programa desarrollado para el análisis de secuencias en general y el estudio de genes con una alta densidad de mutaciones, los datos obtenidos se organizaron en librerías de secuencias creadas para cada uno de los tres grupos de estudio y para relacionar estos datos con otras poblaciones a nivel mundial, y se cotejaron en la Base Mundial de Datos de Mutaciones del Gen receptor de Andrógenos: (The Androgen Receptor Gene Mutations Database World Wide Web Server) <http://androgendb.mcgill.ca/>

Análisis estadístico de las repeticiones polimórficas

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS for Windows 18 ®.

Establecido el genotipo de cada individuo, se realizó el cálculo de las frecuencias de repetición de trinucleótidos en cada grupo de estudio, mediante: tabulación, determinación de frecuencias absolutas, frecuencias relativas, promedios y rangos de repetición. Para establecer si existían diferencias estadísticamente significativas en la distribución de los trinucleótidos entre los tres grupos de estudio, se aplicó la prueba de Chi-cuadrado (χ^2), siendo este, el último análisis estadístico en el que se incluyó a las muestras de la población indígena.

Dentro del análisis del estudio caso control, la distribución de la repetición CAG fue dividida en ocho categorías (≤ 16 , ≤ 18 , ≤ 20 , ≤ 21 , ≤ 22 , ≤ 23 , ≤ 25 , ≤ 26) y la de la repetición GGC se dividió en cuatro (≤ 15 , ≤ 16 , ≤ 17 , ≤ 18), esta categorización permitió establecer el grado en que difieren los datos entre muestras afectas y controles, analizando el número de repeticiones CAG o GGC como variables

dicotómicas de frecuencias acumuladas dependiendo de la categoría de análisis, para esto se aplicó la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) para la bondad de ajuste con la corrección de Yates y la prueba Chi-cuadrado (χ^2) de Mantel-Haenszel en cada categoría de repetición CAG y GGC.

Para determinar la probabilidad de desarrollar cáncer prostático en presencia de repeticiones cortas CAG o fuera del promedio de repetición de 16 a 17 GGC se empleo la prueba de Odds Ratio (ORs) riesgo relativo en tablas de contingencia de 2 x 2 adaptadas para cada categoría.

Para determinados casos en que la categorización de las repeticiones CAG o GGC, presentaban valores con una frecuencia esperada menor a 5 en alguna de las casillas de las de tablas 2 x 2, se aplico el test exacto de Fisher.

En el análisis de las variables clínicas patológicas como el grado de Gleason, el estadio tumoral, márgenes positivos, invasión a vesículas seminales, nivel de PSA, para establecer si tenían correlación con las repeticiones que ciertos estudios las definen como alelos de riesgo, se dividió a la repetición CAG en: (≤ 21 y ≥ 22 CAG) y al repetición GGC en las categorías: (≤ 16 y ≥ 17 GGC).

CAPITULO IV

RESULTADOS

Se determinó un aumento de probabilidad de riesgo al relacionar rangos cortos CAG de forma individual; y en la combinación rangos cortos CAG y rangos largos GGC también fue encontrada dicha correlación, existen diferencias estadísticamente significativas en la distribución de ambos trinucleótidos; por lo que, al analizar la hipótesis planteada mediante la prueba de chi cuadrado se pudo concluir que, la hipótesis alterna es aceptada y la nula rechazada, ya que, determinados rangos en estas repeticiones podrían relacionarse con el riesgo de cáncer prostático y sus etapas más agresivas.

Parámetros biomédicos de las muestras estudiadas.

El número total de muestras analizadas fue de 334 individuos ecuatorianos de sexo masculino, 148 fueron muestras control, 108 adenocarcinomas, y 78 pertenecientes a poblaciones indígenas.

Grupo control y población indígena

Las muestras del grupo control fueron conformadas por individuos mestizos sanos, no presentaron antecedentes de ningún tipo de cáncer, sin exposición prolongada a genotóxicos y hábitos reducidos o nulos de consumo de licor y tabaco. El rango de edad al momento de la toma de la muestra fue entre 40 y 98 años y la edad promedio fue de 62 años; el 40 % de estos individuos tuvieron hasta 55 años de edad, mientras que, el 10% presentaban 84 o mas años. Los niveles del antígeno prostático específico (PSA) se pudieron obtener únicamente en 49 de los 148 individuos (33%) y todos estos presentaron niveles inferiores a los 10 ng/ml (Tabla 1).

El grupo correspondiente a poblaciones indígenas estuvo conformado por individuos, originarios de comunidades indígenas a lo largo de la sierra ecuatoriana, previo a la realización de este estudio, estos individuos fueron sometidos a un análisis genético donde se demostró la presencia de marcadores moleculares que los relacionan a poblaciones nativas americanas, adicionalmente, no presentaron registros de ningún tipo de cáncer, sin exposición prolongada a genotóxicos y hábitos reducidos o nulos de consumo de licor y tabaco. La edad promedio de estos individuos al momento de toma de la muestra fue de 50 años, con un rango entre 19 y 77 años, el 11% presentaron entre 19 y 33 años mientras q el 26% eran mayores de 63 años (Tabla 3).

Parámetros clínico-patológicos de los individuos diagnosticados.

En los 108 individuos mestizos diagnosticados de adenocarcinoma prostático clínicamente localizado y sometidos a prostatectomía radical, la edad media al momento del diagnóstico fue de 69 años, con un rango entre 46 a 93 años. El mayor porcentaje de estos (39%) tenían entre 59 y 70 años, mientras que el 14% tenían 93 o más años de edad (Tabla 2).

Los adenocarcinomas prostáticos presentaron las siguientes características clínico-patológicas, relacionados con el comportamiento biológico del tumor:

Puntuación o grado histológico de Gleason

De los 108 individuos con adenocarcinoma prostático 87 presentaron este tipo de información. De estos, 6 casos el 6,89%, presentaban un grado de Gleason de 2 a 4 diagnosticados como adenocarcinomas bien diferenciados. 56 casos el 64,37% fueron de grado Gleason 5 a 7 diagnosticados como adenocarcinomas moderadamente diferenciados. 25 casos el 28,74% de Gleason 8 a 10 se diagnosticaron como adenocarcinomas pobremente diferenciados. Finalmente el porcentaje de individuos con grado de Gleason 7 fue calculado por separado, ya que, a pesar de ser considerados como grado intermedio también presentan mayor nivel de agresividad (Tabla 2).

Estadio Tumoral

La información respecto al estadio tumoral (TNM) la presentaron 87 individuos. 5 casos el 5,75% corresponden al estadio pT1. 55 casos, el 63,22% pertenecientes al estadio pT2 es decir, adenocarcinoma confinado a la glándula prostática. 26 casos el 29,88% presentaron extensión capsular o extracapsular designado como pT3. Y únicamente solo un caso el 1,15% fue un tumor que invadía a estructuras adyacentes diferentes a las vesículas seminales pT4 (Tabla 2).

Invasión a las vesículas seminales, perineural, linfovascular, márgenes quirúrgicos positivos y metástasis

La invasión hacia las vesículas seminales se registra a partir del estadio pT3. Los casos a partir de este estadio que fueron el total de 26. De estos, 7 casos es decir el 25,938% presentaron invasión a las vesículas seminales y 20 el 74,07% no presentaron dicha invasión (Tabla 2).

En lo que respecta a la invasión perineural, se obtuvieron los datos de 70 casos, 20 de estos el 27.40% presentaban invasión perineural y 53 es decir el 72.60% no la presentaban.

La invasión linfovascular se registró en 73 casos, 3 casos el 4% presentaron invasión linfovascular y 66 el 96% no presentaban esta invasión (Tabla 2).

En relación a los márgenes quirúrgicos positivos, 69 casos contaron con los datos necesarios; de los cuáles 59 el 85.51% tenían bordes quirúrgicos negativos y únicamente 10 es decir el 14.49% presentaban márgenes quirúrgicos positivos (Tabla 2).

Del total de 108 muestras de adenocarcinoma, únicamente 8 el 7,41% presentaron metástasis a varios órganos tales como: testículos, hígado, cráneo, esternón, columna dorsal entre otros. Las muestras restantes es decir 100 casos (92.59%) no presentaron metástasis (Tabla 2).

Niveles preoperatorios del antígeno prostático específico (PSA)

De los 108 casos de adenocarcinoma prostático 94 casos presentaron datos para esta variable. 8 casos el 8,51% registraron valores ≤ 4 ng/ml, 24 casos el 25,53% registraron entre 4.1 a 10 -0 ng/ml, 22 casos el 23,4% para valores entre 10.1 a 20.0 ng/ml, y 40 casos el 42,55% registraron niveles mayores a 20 ng/ml (Tabla 2).

Variantes polimórficas de las repeticiones CAG y GGC del gen receptor de andrógenos

Variantes polimórficas de la repetición CAG

Se analizaron un total de 334 individuos. De estos, 148 fueron muestras control provenientes de individuos mestizos sanos, 108 muestras provenientes de individuos mestizos diagnosticados con adenocarcinoma prostático sometidos a prostatectomía radical y 78 muestras de individuos sanos pertenecientes a poblaciones indígenas.

Las secuencias obtenidas mediante secuenciación, lectura génica y alineación de las repeticiones CAG, permitieron detectar 19 variantes de repetición polimórfica en los adenocarcinomas, los fragmentos analizados correspondieron a secuencias cuyo tamaño se extendía

desde los 200 hasta los 254 pares de bases, conteniendo de 12 a 30 trinucleótidos. En las muestras de la población control se detectaron 15 variantes de repetición polimórfica, el tamaño de los fragmentos fue de 212 hasta 254 pares de bases contabilizándose de 16 a 30 CAG y las muestras de la población indígena presentaron 12 secuencias de diferente tamaño entre 218 y 251 pares de bases, es decir entre 18 y 29 trinucleótidos CAG (Tabla 4).

Independientemente del tamaño de las secuencias y del total de bases alineadas, se detectaron 164 sitios invariables o monomórficos; los sitios variables o polimórficos correspondieron exclusivamente al número de repeticiones CAG. El número de variantes de repetición polimórfica sugiere una considerable heterogeneidad genética en relación al número de trinucleótidos CAG y una alta homogeneidad genética en el resto de la secuencia amplificada.

Variantes polimórficas de la repetición GGC

El total de individuos analizados para esta repetición fue de 321, el número de adenocarcinomas y población indígena es el mismo que en la otra repetición, 108 y 78 respectivamente, sin embargo, el número de individuos control se redujo a 135.

En las muestras de adenocarcinoma se encontraron 6 variantes de repetición polimórfica, los fragmentos correspondieron a secuencias cuyo tamaño se extendía desde los 183 hasta los 198 pares de bases, contabilizándose de 13 a 18 GGC. En las muestras control se detectaron 4 variantes de repetición polimórfica, el tamaño de los fragmentos fue de 177 a 198 pares de bases y de 15 a 18 trinucleótidos y finalmente en las muestras de la población indígena se detectaron 6 tipos de secuencias con un tamaño entre 180 y 198 pares de bases, conteniendo 14 y 18 trinucleótidos GGC (Tabla 5).

El número de variantes de repetición polimórfica sugiere una considerable heterogeneidad genética en relación al número de trinucleótidos GGC y una alta homogeneidad genética en el resto de la secuencia amplificada. Cada una de las muestras presentó 144 sitios invariables o monomórficos; mientras que, los sitios variables o polimórficos correspondieron exclusivamente al número de repeticiones GGC.

Frecuencia y distribución de las repeticiones CAG

La distribución de las frecuencias de la repetición CAG del gen Receptor de Andrógenos se detalla en la tabla 4 y se representan en la gráfica 1 respectivamente. En el grupo de individuos diagnosticados de Adenocarcinoma prostático se determinó una longitud o tamaño de 12 hasta 30 repeticiones y un promedio de 20 CAG, los alelos de mayor frecuencia corresponden a 21 CAG (15,7%) y 22 CAG (12%). El grupo control presento un tamaño de 16 hasta 30 repeticiones CAG con un promedio de 22, los alelos de mayor frecuencia fueron 22 CAG (25,7%), 23 CAG (9,5%) y 25 CAG (12,8%). En cuanto a las muestras de población indígena el tamaño de repetición se extiende desde 18 hasta 29 CAG, determinándose el promedio de repetición más alto de los tres grupos correspondiente a 24 CAG, los alelos de mayor frecuencia corresponden a 24 CAG y 26 CAG ambas con el 24,4%. Mediante la prueba de Chi-cuadrado (X^2) se determinaron diferencias altamente significativas en cuanto a la distribución de la repetición CAG en los tres grupos de estudio ($p < 0,001$).

Frecuencia y distribución de las repeticiones GGC

La distribución de las frecuencias de la repetición GGC se detalla en la tabla 5 y se representan en la grafica 2. En las muestras de Adenocarcinomas prostáticos el tamaño de la repetición GGC fue de 13 a 18 GGC con un promedio de 16, los alelos de mayor frecuencia fueron aquellos con un tamaño de 16(25%) y 17(55,6%) repeticiones. El grupo control presentó un tamaño entre 15 y 18 repeticiones GGC y un promedio de 17, siendo los tamaños de 16 y 17 GGC los mas frecuentes con un porcentaje del 17,8% y 59,3% respectivamente. Las muestras de la población indígena presentaron un tamaño de 14 hasta 18 repeticiones GGC con un promedio de 17, los alelos de mayor frecuencia fueron 17 GGC (50%) y 18 GGC (24,4%). Para poder determinar si existían diferencias entre las frecuencias de la repetición GGC de estos tres grupos de estudio, se realizó la prueba del Chi-cuadrado(X^2), encontrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$) (Tabla 5).

Análisis e interpretación de resultados

Análisis estadístico de los parámetros Clínicos – Patológicos en las piezas tumorales

Grado de Gleason relacionado al estadio tumoral

La asociación estadística entre Grado de Gleason y estadio tumoral fue realizada en solo 87 casos que disponían de esta información. A fin de analizar estos parámetros como variables dicotómicas y de acuerdo a la literatura (Segarra, Millán, Palou, & Villavicencio, Factores pronósticos y tablas predictivas del cáncer de próstata clínicamente localizado, 2006), se categorizó a los tumores con grado de Gleason de 2 – 6 como adenocarcinomas de bajo grado y a los de grado de Gleason de 7 a 10 como adenocarcinomas de alto grado. En relación al estadio tumoral se categorizaron como T1 hasta T2b y T2b hasta T4. Es así que, 33 de 46 (71,74%) piezas tumorales con grado de Gleason de 2 a 6 presentaron un estadio tumoral de T1 hasta T2b; es decir eran adenocarcinomas limitados a la próstata, y no involucraban a ambos lóbulos. Piezas tumorales con grado de Gleason de 7 a 10 y estadio tumoral entre T2c a T4, se presentaron 31 de 45 (68,89%), por lo que eran tumores que involucraban los dos lóbulos, podían extenderse a través de la cápsula prostática, extensión extracapsular e incluso llegaban a invadir estructuras adyacentes distintas a las vesículas seminales. Mediante la aplicación de la prueba de Chi-cuadrado(X^2), se establecieron diferencias altamente significativas relacionando el mayor grado de Gleason con el mayor estadio tumoral ($p < 0,001$) (Tabla 6).

Grado de Gleason relacionado a los Márgenes Quirúrgicos positivos.

La relación entre el Grado de Gleason y los Márgenes Quirúrgicos positivos fue calculada en 68 casos, se mantuvo la anterior categorización para el grado de Gleason y los márgenes quirúrgicos positivos se clasificaron como presente y ausente. Únicamente 10 casos presentaron márgenes quirúrgicos positivos y 7 de estos presentaban una gradación baja por lo que, 32 de 39 (82%) piezas tumorales con grado de Gleason de 2 a 6 no presentaron márgenes quirúrgicos positivos, y únicamente 3 de 29 (10,34%) muestras con grado de Gleason alto si presentaron márgenes quirúrgicos positivos. Mediante la prueba de Chi-cuadrado(X^2) con corrección de Yates se determinó que no existía relación entre el Grado de Gleason y Márgenes Quirúrgicos positivos ($p > 0,005$) (Tabla 6).

Grado de Gleason relacionado a la Invasión a Vesículas Seminales.

Al relacionar el Grado de Gleason con la Invasión a Vesículas Seminales se analizaron 70 casos. De los 7 que presentaron Invasión, 6 (85,71%) presentaban un grado de Gleason alto, además 36 de los 37 (97,3%) tumores con grado de Gleason bajo no presentaban invasión. Aplicando la

prueba de Chi-cuadrado(X^2) con corrección de Yates no se encontró diferencias significativas, por lo que no existe relación entre estos dos parámetros ($p>0,005$) (Tabla 6).

Grado de Gleason relacionado a presencia de Metástasis.

De los 87 casos que presentaron información para el análisis de estos dos parámetros únicamente 8 desarrollaron metástasis, 4 fueron determinados en grados de Gleason bajo y 4 en alto. Al realizar el test exacto de Fisher no se evidenciaron diferencias significativas, determinado que no existe relación entre el grado de Gleason y la presencia de metástasis ($p>0,005$) (Tabla 6).

Grado de Gleason relacionado a los niveles de PSA preoperatorio.

87 casos fueron analizados para establecer si existe o no relación entre estos dos parámetros. Los niveles de PSA preoperatorio fueron clasificados como mayores o menores a 20 ng/ml. Por lo que, 35 de 46 (76,09%) tumores con grado de Gleason bajo presentaron valores inferiores a 20 ng/ml, mientras que 27 de 41 (65,85%) correspondieron a niveles de Gleason alto y valores superiores a los a 20 ng/ml. Los niveles promedio del PSA en tumores de alto y bajo estadio fueron de 65,83ng/ml y 25,93ng/ml respectivamente. La prueba de Chi-cuadrado(X^2) reveló diferencia altamente significativas por lo que en los tumores con mayor grado de gleason se incremento los niveles de PSA ($p<0,001$) (Tabla 6).

Estadio tumoral relacionado a los Márgenes Quirúrgicos positivos.

El análisis estadístico entre estadio tumoral y márgenes quirúrgicos positivos fue realizado en 78 muestras de adenocarcinoma prostático. El estadio tumoral para ser considerado como una variable dicotómica fue dividido de T1 hasta T2b, considerados como tumores de bajo estadio y de T2b hasta T4, como tumores de alto grado, los márgenes quirúrgicos positivos se dividieron en presentes y ausentes. De los 10 casos que presentaron márgenes quirúrgicos positivos 7(70%) corresponden a tumores de bajo estadio y de los 34 tumores de alto grado únicamente 3 (8,82%) presentaban márgenes quirúrgicos positivos. Se empleo la prueba de X^2 y no se encontraron diferencias significativas ($p>0,005$) (Tabla 6). Por lo que, el estadio tumoral no se encuentra relacionado con la presencia de márgenes quirúrgicos positivos.

Estadio tumoral e Invasión a Vesículas Seminales.

La relación entre estos parámetro fue evaluada en 87 casos. De los 39 tumores de bajo grado ninguno presento invasión a vesículas seminales y en los tumores de alto grado 41 de 48 (85,42%) si, por lo cual, 7 (100%) que presentaron invasión a vesículas seminales pertenecían a tumores de alto grado T3. Al aplicar la prueba estadística del test exacto de Fisher se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0,05$) (Tabla 6). Relacionando al estadio tumoral con la invasión a vesículas seminales.

Estadio tumoral y Metástasis.

De las ocho muestras que presentaron metástasis 6 (75%) se presentaron en tumores de alto grado mientras que 2(25%) se presentaron en tumores de bajo estadio tumoral. La prueba estadística utilizada en este caso fue test exacto de Fisher, no se determino significancia estadística ($p > 0,05$) (Tabla 6), ni relación entre el estadio tumoral y metástasis.

Estadio tumoral relacionado a niveles de PSA preoperatorio.

Se analizaron 87muestras, donde el 56,25% es decir 27 de 48 tumores con alto estadio presentaron valores de PSA preoperatorio superiores a 20 ng/ml, mientras que el 71,79% es decir 28 de 39 muestras con un estadio tumoral bajo mostraron un nivel de PSA igual o menor a 20 ng/ml. El nivel promedio del PSA en tumores de alto estadio fue de 59,31 ng/ml y en los tumores de bajo estadio de 38,17ng/ml. Mediante la prueba de χ^2 se hallaron diferencias significativas ($p < 0,01$) (Tabla 6), determinando que los niveles de PSA se incrementan en tumores de mayor estadio tumoral.

Análisis estadístico de las Repeticiones CAG y GGC asociadas al riesgo de cáncer prostático.

Los siguientes análisis estadísticos excluyeron a las muestras de la población indígena, ya que, al no conocer registros de cáncer prostático para este grupo poblacional, no pudieron ser incluidas dentro del análisis epidemiológico de caso control. Por consiguiente las muestras empleadas para determinar la asociación entre en número de repeticiones CAG y GGC con el riesgo de cáncer de próstata fueron las conformadas por el grupo individuos mestizos con diagnostico de adenocarcinoma prostático, definidos como: Casos y el grupo de individuos mestizos sanos definidos como: Controles.

Repeticiones CAG asociadas al riesgo de cáncer prostático.

A fin de determinar un progresivo incremento del riesgo de cáncer prostático asociado con el decrecimiento del tamaño o la longitud de la repetición CAG, se dividió a esta repetición de longitud polimórfica en ocho categorías (≤ 16 , ≤ 18 , ≤ 20 , ≤ 21 , ≤ 22 , ≤ 23 , ≤ 25 y ≤ 26), de esta manera se analizaron 7 decrecimientos CAG, esta categorización se realizó en consideración de los alelos definidos por ciertos estudios como de riesgo y en una distribución de frecuencias lo más homogénea posible. Para evaluar si determinado número de repeticiones CAG confieren riesgo de cáncer prostático, se realizó la prueba de odds ratio (OR) en tablas de 2 x 2, este cálculo se realizó mediante frecuencias iguales o menores a cierto número de repetición CAG, comparadas con todas las frecuencias restantes mayores a ese número de repetición, de esta manera se crearon variables dicotómicas que tenían un OR y un X^2 para cada uno de 7 decrecimientos CAG.

Las longitudes CAG que presentaron OR y X^2 estadísticamente significativos fueron las comprendidas en las cinco primeras categorías (≤ 16 , ≤ 18 , ≤ 20 , ≤ 21 y ≤ 22) es así que, estos individuos, todos con ≤ 22 repeticiones CAG presentaron mayores probabilidades de desarrollar cáncer de próstata: ≤ 16 repeticiones CAG (OR=5,67; IC 95% = 2,56-12,58; $p<0,001$), ≤ 18 repeticiones CAG (OR = 2,95; IC 95% = 1,63 - 5,35; $p<0,001$), ≤ 20 repeticiones CAG (OR = 2,27; IC 95% = 1,35 - 3,81; $p<0,005$), repeticiones CAG ≤ 21 (OR= 2,99; IC 95% = 1,79 - 5,01; $p<0,001$), y repeticiones ≤ 22 CAG (OR =1,86; IC 95%= 1,07-3,24; $p<0,05$). Determinándose una probabilidad de riesgo 5,67 veces mayor de presentar cáncer prostático en los individuos con ≤ 16 repeticiones CAG; 2,95 veces mayor en individuos con ≤ 18 CAG; 2,27 veces mayor para repeticiones ≤ 20 CAG; 2,99 para ≤ 21 CAG y una probabilidad de 1,86 veces más alta en individuos con ≤ 22 repeticiones CAG. Las repeticiones comprendidas en las categorías restantes (≤ 23 , ≤ 25 y ≤ 26) CAG no presentaron indicadores de riesgo estadísticamente significativos, y de la misma forma la prueba de X^2 no determino diferencias significativas (Tabla 7).

Repeticiones GGC asociadas al riesgo de cáncer prostático.

Para el análisis de los trinucleótidos GGC entre casos y controles, se establecieron cuatro categorías (≤ 15 , ≤ 16 , ≤ 17 y ≤ 18), esta categorización se realizó con el fin de determinar el número de repeticiones GGC posiblemente relacionadas con el riesgo de cáncer prostático en tres decrecimientos,

las pruebas estadísticas utilizadas fueron odds ratio (OR) y chi cuadrado (X^2) mediante tablas de 2 x 2, estos cálculos se realizaron de forma similar que en la otra repetición polimórfica, es decir, frecuencias iguales o menores a cierto número de repetición GGC comparadas con las frecuencias restantes mayores a ese número de repetición, estableciendo variables dicotómicas con un OR y X^2 cada categoría.

En ninguno de los tres decrecimientos GGC se determinó un número de repeticiones que confieran riesgo, o que indique diferencias estadísticamente significativas, es así que, para repeticiones ≤ 15 GGC se determinó (OR = 1,39; IC 95% = 0,64 - 3,03; $p > 0,05$), ≤ 16 repeticiones GGC (OR = 1,62; IC 95% = 0,95-2,78; $p > 0,05$), y ≤ 17 GGC (OR = 2,5; IC 95% = 0,93 - 6,45; $p > 0,05$) (Tabla 8).

Análisis estadístico de las Repeticiones CAG y GGC asociadas a las variables clínicas.

Para evaluar si las repeticiones de riesgo CAG y GGC, reportados en otras investigaciones, están asociadas con la agresividad del cáncer prostático, se estratificó a las repeticiones polimórficas del trinucleótido CAG en: (≤ 21 CAG vs ≥ 22 CAG) y a la repetición GGC en: (≤ 16 GGC vs ≥ 17 GGC). De igual manera se categorizó a las variables clínico-patológicas de las piezas tumorales. Se utilizaron las recomendaciones dadas por (Segarra, Millán, Palou, & Villavicencio, Factores pronósticos y tablas predictivas del cáncer de próstata clínicamente localizado, 2006) para establecer variables dicotómicas. El grado de Gleason se dividió en 2-6 y 7-10, el estadio tumoral como T1-T2b y T2c-T4, el nivel de PSA en < 20 ng/ml y ≥ 20 ng/ml; y por último se estratificó a los márgenes quirúrgicos positivos e invasión a vesículas seminales como ausentes y presentes

Repetición ≤ 21 CAG asociada a las variables clínico patológicas

Se determinaron diferencias altamente significativas entre el estadio tumoral y repeticiones ≤ 21 CAG ($p < 0,005$); de las 87 muestras analizadas 40 (45,97%) presentaron un grado de Gleason entre T2c-T4 y ≤ 21 CAG en comparación con las 8 (9,19%) muestras ≥ 22 CAG y alto grado, el OR calculado de 4,75; IC 95% = 1,77-12,72, muestra un incremento 4,75 veces mayor de presentar un estadio tumoral alto en repeticiones dentro de este rango (Tabla 8).

Al relacionar el grado histológico de Gleason con repeticiones ≤ 21 CAG, se determinó un OR de 2,9; IC 95% = 1,1-7,66 que demuestra un incremento en el riesgo, además se encontraron

diferencias significativas ($p < 0,05$). De entre las muestras con grado de Gleason alto (T2c - T4), 33 (37,9%) presentaron ≤ 21 CAG, mientras que, 8 (9,19%) presentaron ≥ 22 CAG (Tabla 8).

En cuanto al PSA preoperatorio y ≤ 21 CAG, el OR calculado fue de 1,27; IC 95% = 0,53 – 3,04, para este caso el cálculo de OR se designó como nulo ya que se acerca al uno y el intervalo de confianza contiene a la unidad, demostrando que no existe relación de riesgo o protección, lo que se confirmó con el valor ($p > 0,05$). (Tabla 8).

Se encontraron diferencias altamente significativas entre la presencia de márgenes quirúrgicos positivos y la repetición de riesgo CAG ($p < 0,005$). Tan solo siete, es decir, el 10,14% de las 69 muestras analizadas presentaron márgenes positivos y ≤ 21 CAG, se determinó un OR de 1,19; IC 95% = 0,28-5,13 que no confiere ni riesgo ni protección (Tabla 8).

El 22,2% de los individuos con repeticiones ≤ 21 CAG, presentaron invasión a las vesículas seminales; en comparación con tan solo el 3,7% de los individuos con ≥ 22 CAG. El OR calculado fue de 1,5; IC 95% = 0,14 – 16,27 sin embargo, el test exacto de Fisher no determinó diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$), confirmando que el valor de OR no confiere riesgo (Tabla 8).

Repetición ≤ 16 GGC asociada a las variables clínico patológicas

Se observó una distribución casi equitativa del número de muestras ≤ 16 GGC y ≥ 17 GGC en relación al estadio tumoral T1-T2b y T2c-T4, por lo que no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$). El valor del OR de 1,07; IC 95% = 0,45 - 2,58, no confiere riesgo ni protección (Tabla 10).

No se encontraron diferencias significativas entre niveles de Gleason 7-10 y repeticiones ≤ 16 GGC ($p > 0,05$). El OR calculado fue de 0,66; IC 95% = 0,27-1,59, por lo que, este rango de repetición no está relacionada con factores de riesgo o protección (Tabla 10).

Entre los individuos que presentaron niveles de ~~PSA~~ PSA ng/ml, se observó el mismo porcentaje (21,28%) para las repeticiones ≤ 16 GGC y ≥ 17 GGC. Se calculó un OR = 2,18 con un intervalo IC 95% = 0,94-5,01, sin embargo el valor ($p > 0,05$) fue estadísticamente no significativo, por lo que, queda establecido que no es un valor real de riesgo (Tabla 10).

3 muestras el 4,35% de los 69 individuos analizados presentaron márgenes quirúrgicos positivos y repeticiones ≤ 16 GGC. Las diferencias estadísticas encontradas no fueron significativas ($p > 0,05$) y el OR calculado de 0,78; IC 95% = 0,18-3,32 fue nulo ya que el intervalo contiene al uno por lo tanto no confiere ni riesgo ni protección (Tabla 10).

Tan solo el 1,41% de los 71 individuos analizados presentaron ≤ 16 GGC e invasión a vesículas seminales. Sin embargo mediante el test exacto de Fisher no se establecieron diferencias significativas ($p > 0,05$), ratificando que, el valor del OR = 0,28; IC 95% = 0,03-2,45 no confiere riesgo ni protección (Tabla 10).

Análisis estadístico de las Repeticiones CAG + GGC combinadas, asociadas al riesgo de cáncer prostático y a cinco variables clínico patológicas.

Para el caso de la repetición CAG, existen diversos estudios donde las repeticiones ≤ 21 CAG han sido asociadas con un incremento del riesgo de cáncer prostático como también a etapas más agresivas de dicha enfermedad (Irvine R. , Yu, Ross, & Coetzee, 1995; Giovannucci, y otros, 1997; Ingles, y otros, 1997), sin embargo para el caso del trinucleótido GGC, existen reportes donde se han encontrado relación de riesgo con repeticiones largas y cortas (Irvine R. , Yu, Ross, & Coetzee, 1995; Stanford, y otros, 1997), por lo que , se realizaron análisis de riesgo combinando las repeticiones (≤ 21 CAG + ≤ 16 GGC) y (≤ 21 CAG + ≥ 17 GGC), y de esta manera, determinar si existe relación entre secuencias cortas de CAG combinadas con secuencias cortas y largas GGC.

Repeticiones ≤ 21 CAG + ≤ 16 GGC combinadas, asociadas al riesgo de cáncer prostático y a cinco variables clínico patológicas

Con el fin de determinar si las repeticiones cortas (≤ 21 CAG + ≤ 16 GGC) combinadas, están asociadas con el riesgo o la agresividad del cáncer prostático, a las frecuencias de la repetición polimórfica del trinucleótido CAG ≤ 21 se adicionó las frecuencias de la repetición polimórfica del trinucleótido GGC ≤ 16 ; y esta sumatoria fue comparada con el resto de secuencias CAG+GGC. Para el análisis de riesgo al cáncer prostático se analizaron 108 muestras de casos y 135 muestras control, mientras que, para el análisis del las cinco variables clínico patológicas se emplearon únicamente las muestras de adenocarcinomas que poseían la respectiva información clínica.

No se determinaron diferencias significativas entre repeticiones ≤ 21 CAG + ≤ 16 GGC y el riesgo al cáncer prostático ($p > 0,05$); tan solo el 8,23% de los controles y el 10,7% de los casos presentaron repeticiones cortas para ambos trinucleótidos. El valor del OR de 1,82; IC 95% = 0,95 - 3,49, no confiere ni riesgo ni protección (Tabla 11).

En relación a la combinación ≤ 21 CAG + ≤ 16 GGC y las cinco variables clínico patológicas, no se determinaron diferencias significativas para ningún caso ($p > 0,05$). El valor de OR en el análisis del estadio tumoral fue de 1,51; IC 95% = 0,58 - 3,99; en el nivel de Gleason OR = 1,17; IC=95% = 0,46-3,0; PSA OR = 0,75; IC 95% = 0,29-1,95; márgenes quirúrgicos OR= 0,73; IC 95%=0,14-3,84 e invasión a vesicular seminales el OR fue de 0,5 IC 95%=0,05-4,47; por lo que no existe relación de protección o riesgo de las repeticiones cortas CAG+GGC para ninguna de las variables analizadas (Tabla 12).

Repeticiones ≤ 21 CAG + ≥ 17 GGC combinadas, asociadas al riesgo de cáncer prostático y a cinco variables clínico patológicas.

Para relacionar las repeticiones cortas CAG y repeticiones largas GGC (CAG + ≥ 17 GGC) con el riesgo y etapas más agresivas del cáncer de la próstata; las frecuencias de la repetición CAG ≤ 21 fueron adicionadas a las frecuencias de la repetición GGC ≥ 17 ; y esta sumatoria fue comparada con la totalidad de las secuencias restantes. Se analizaron 108 casos y 135 controles para el análisis de riesgo de cáncer prostático, y para establecer la relación de riesgo asociada a las cinco variables clínico patológicas, se trabajó con las muestras de adenocarcinomas que presentaron la información requerida.

En el caso de las repeticiones ≤ 21 CAG + ≥ 17 GGC, se determinó diferencias significativas ($p < 0,005$); por lo que individuos que poseen ambos rangos de repetición tienen una probabilidad 2,42 veces mayor de presentar cáncer de próstata (OR = 2,42; IC 95% = 1,38 - 4,25) (Tabla 13)

De igual manera, al relacionar estas dos repeticiones con el estadio tumoral se calculó un OR = 2,77; IC 95% = 1,13 - 6,79, mostrando un incremento en el riesgo; además encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$). Estos datos contrastan con el resto de variables clínico patológicas como nivel de Gleason, PSA, márgenes quirúrgicos e invasión a vesículas seminales, que a pesar de presentar

valores de OR considerables, sus valores de $p > 0,05$ no son estadísticamente significativos, por lo que no confieren riesgo (Tabla 14).

Discusión de resultados

El Cáncer prostático es uno de los principales problemas médicos en todo el mundo, debido a que es uno de los cánceres más diagnosticados y una de las principales causas de muerte en la población masculina. La identificación de marcadores moleculares relacionados al cáncer de próstata constituye

un gran avance que ha mejorado la capacidad para detectar individuos de riesgo (Reinolds, Kastury, Groskopf, Scahlken, & Rittenhouse, 2007)

La acción de hormonas esteroideas tales como los andrógenos regulan el funcionamiento y mantenimiento normal de la glándula prostática a través de genes específicos. Es así que, el gen receptor de andrógenos ejerce un papel de gran importancia no solo en el desarrollo adecuado de esta glándula manteniendo su estructura y función, sino también participa en el desarrollo y progresión de patologías asociadas con la edad del hombre como son la hiperplasia y el cáncer prostático. Las repeticiones CAG y GGC del gen receptor de andrógenos, secuencias definidas como altamente polimórficas y relacionadas a procesos patológicos en determinados grupos poblacionales, fueron objetos de análisis del presente estudio, con el fin de establecer su relación con el riesgo de cáncer prostático y con ciertas variables clínico patológicas en determinados grupos poblacionales del Ecuador.

Variables clínico-patológicas en adenocarcinomas prostáticos

La incidencia del cáncer de próstata se incrementa de forma significativa con la edad. Esta correlación también fue determinada en la población afectada de este estudio, es así que, la la edad media al momento del diagnóstico fue de 69 años, con un rango entre 46 a 93 años, estos datos concuerdan con el rango de edades comprendidas entre 45 y 89 años en donde según numerosos reportes se encuentra el 95% de los canceres prostáticos (Wingo, Landis, & Ries, 1997) . De la misma forma se estima que por debajo de los 50 años este cáncer afectaría a un 1 o 4 % de la población (Smith, y otros, 2000), y en el caso, de las muestras analizadas solo un individuo el 0,93% se ubica debajo de los 50 años de edad (Tabla 2).

El grado histológico de Gleason, estadio tumoral, nivel de PSA, invasión a vesículas seminales, estado del margen quirúrgico y metástasis constituyen algunas de las variables clínico-patológicas mas importantes que permiten predecir el comportamiento biológico del tumor; y de esta manera decidir un adecuado método terapéutico (Djavan, Kadesky, & Klopukh, 1999; Stamey, y otros, 2002; Scherr, Swindle, & Scardino, 2003). Se determinaron importantes correlaciones positivas entre ciertos parámetros clínico-patológicos.

Está ampliamente documentado que el grado Histológico de Gleason es un importante factor pronóstico para la toma de decisiones terapéuticas ya que permite determinar la probabilidad de

progresión y supervivencia en pacientes con adenocarcinomas de la próstata (Narain, y otros, 2001; Derweesh, y otros, 2004). La gradación histológica de Gleason presentó relaciones altamente significativas con el estadio tumoral y el nivel del PSA ($p < 0,001$) (Tabla 5 o 6). Estos resultados indican que los individuos con mayor grado histológico de Gleason presentarán mayor estadio tumoral y nivel de PSA, existiendo una correlación predictiva de mal pronóstico entre estos tres factores. Dicho análisis se encuentra dentro de los datos reportados por otros autores que señalan que la combinación de grado de Gleason 2 – 5, estadios tumorales bajos T1 –T2 y PSA $\leq 4,0$ ng/ml constituyen una categoría de buen pronóstico; mientras que grado de Gleason 6 – 10, estadios tumorales altos T3 –T4 y PSA $> 4,0$ ng/ml indican un mal pronóstico (Bostwick, y otros, 1999; Marberger, 2007; Tapia, y otros, 2011).

Al relacionar el grado histológico de Gleason con la presencia de márgenes quirúrgicos, invasión a vesículas seminales y metástasis no se determinaron diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$). Estos tres últimos parámetros mencionados constituyen factores de mal pronóstico con bajas tasas de supervivencia, siendo relacionados con una mayor de progresión del cáncer y fallo bioquímico (Bostwick, y otros, 1999; Ward, Slezak, Blute, Bergstralh, & Zincke, 2005). Estos datos contradicen lo que cita la literatura, puesto que adenocarcinomas de mayor grado de Gleason presentan invasión a vesículas seminales, extensión extracapsular, volumen tumoral aumentado, márgenes quirúrgicos positivos o PSA alto (Halvorsen, Haukaas, Hoisaeter, & Akslen, 2000; Freedland, y otros, 2004); esto podría deberse al reducido número de casos que presentan invasión a las vesículas seminales (7), además que es posible que el significado pronóstico de la invasión de vesículas seminales no sea constante, y que dependa de la zona de las vesículas que el observador determine como afectada (Debras, Guillonneau, Bougaran, Chambon, & Vallancien, 1998). Sin embargo, al relacionar el estadio tumoral con la invasión de vesículas seminales, los resultados mostraron una relación estadística significativa ($p < 0,05$), por lo tanto, en las muestras analizadas estadios tumorales altos presentan invasión a vesículas seminales, de hecho, de los 7 de individuos que presentaron dicha invasión todos presentaban estadios T3-T4 (Tabla 5 o 6).

En relación a los márgenes quirúrgicos positivos algunos autores han encontrado una asociación de este parámetro con otras variables como nivel y estadios altos que empeoran el pronóstico, sin embargo, en otros casos se ha encontrado esta significación pronóstica de forma independiente (Epstein, Carmichael, & Walsh, 1993). Es así que, no se determinaron diferencias estadísticas significativas entre márgenes quirúrgicos positivos relacionados con el nivel de Gleason o estadio tumoral ($p > 0,05$) (Tabla 5 o 6); únicamente el 14,49% de los 69 individuos analizados

presentaron afectación del margen quirúrgico, este porcentaje tan bajo probablemente corresponda a diagnósticos histopatológicos no claros para definir a los márgenes como positivos o negativos (Jhaveri, Klein, Kupelian, Zippe, & Levin, 1999).

El PSA es considerado como uno de los principales instrumentos diagnósticos para obtener indicios de cáncer prostático, además de proporcionar la información más relevante para el seguimiento de los pacientes (Lilja & Christensson, 1999). De igual manera que en el grado de Gleason, el estadio tumoral presentó diferencias estadísticas altamente significativas al ser asociado con el PSA ($p < 0,01$), indicando que el estadio tumoral se relaciona directamente con el aumento en los niveles de este factor (Tabla 5 o 6), esto concuerda con lo que se describe en la literatura (D'Amico, Renshaw, Sussman, & Chen, 2005); de los individuos con niveles de PSA $< 10\text{ng/ml}$, la mayoría presenta adenocarcinoma confinado a la próstata, y de los que presentan niveles $\geq 30\text{ng/ml}$ tienen un 50% más probabilidades de presentar cáncer prostático no localizado y con penetración capsular (Lara, Déniz, Ruíz, Pinar, & Sáez-Bravo, 2004)

Un mayor riesgo de metástasis ha sido asociado con nivel de Gleason alto, estadios tumorales T2b-T3, valores altos de PSA, y la invasión tumoral perineural (Dawson & McLeod, 1997; Bellmunt, Rosenberg, & Choueiri, 2009). Sin embargo, estos datos contrastan con los resultados de este estudio, donde no se determinó asociación estadística entre la presencia de metástasis y grado de Gleason o estadio tumoral ($p > 0,05$) (Tabla 5 o 6); probablemente esto se deba a que solamente 8 individuos presentaron metástasis, por lo cual, al existir mayor cantidad de muestras con esta variable la asociación reportada en la literatura eventualmente sea evidente.

Frecuencia y distribución CAG-GGC

Se ha documentado que la repeticiones polimórficas CAG y GGC del gen receptor de andrógenos varía de una manera específica dependiendo de la etnia o grupo poblacional estudiado (Sartor, Zheng, & Eastham, 1999; Kittles, Young, & Weinrich, 2001). La distribución normal de la repetición CAG se reporta en un rango de 6-39, con una promedio de 19-20 en los afro-americanos, 21-22 en población caucásica, 22-23 en asiáticas y 23 en hispanos residentes en EE.UU o Europa (Krausz, 2012). El rango de la repetición CAG de las muestras control pertenecientes a población

mestiza ecuatoriana, fue de 16 a 30 con un promedio de 22 (Tabla 4), que se asemeja principalmente al de las poblaciones asiáticas, a más de ser una repetición de considerable frecuencia en población caucásica europea. Otros polimorfismos relacionados con cáncer prostático en población ecuatoriana también muestran frecuencias similares a las poblaciones asiáticas (Paz-y-Miño, y otros, 2009). La posible causa de no evidenciarse similitud de promedios con las poblaciones hispanas de EE.UU y Europa podría ser, a que este grupo no presentan individuos provenientes de Ecuador, puesto que, en la investigación de Krausz (2012) no especifica nacionalidades. La comparación con regiones de Suramérica fue limitada ya que los estudios al respecto son provenientes de Brasil, el primer trabajo reporta un promedio de 20,65CAG para una población de 200 individuos caucásicos y afro descendientes, asumiendo que por este último grupo étnico el promedio de repetición es relativamente bajo (Ribeiro, Santos, Carvalho-Salles, & Hackel, 2002); y en el segundo análisis el promedio reportado fue 21,62 CAG en 88 individuos caucásicos (Biolchi, Neto, Koff, & Simoni, 2012).

En las muestras de adenocarcinomas analizada en esta investigación, el rango de 12-30 y promedio 20 CAG, es similar a la población brasileña sana estudiada por Ribeiro. (2012). Y aunque una gran cantidad de estudios concluyen que repeticiones menores a 21CAG se presentan en mayor frecuencia en individuos con cáncer prosaico, el promedio CAG de adenocarcinomas en la población mestiza ecuatoriana coincide ligeramente con poblaciones de alto riesgo como son los afro-americanos (19 CAG en adenocarcinomas y 19-20 CAG en controles) (Cicek, y otros, 2004) y australianos (21,95 CAG para casos y controles) (Beilin, y otros, 2001).

La variación en el número de trinucleótidos GGC también ha sido demostrada en un amplio conjunto de poblaciones, sin embargo no es tan polimórfica como la repetición CAG (Esteban, y otros, 2006), en este estudio el rango de repetición fue de 15-18 y un promedio de 17 GGC (Tabla 4). Estos datos concuerdan con el rango normal de 16-18 GGC encontrados en el 90% de la población mundial (Edwards, y otros, 1999), lo promedios de repetición son de 14-15 en afro-americanos y nativo africanos (Hakimi, Schoenberg, & Rondinelli, 1997), 16 en poblaciones asiáticas (Irvine R. , Yu, Ross, & Coetzee, 1995), 15-16 en caucásicos americanos, europeos y poblaciones mediterráneas (Esteban, y otros, 2006) . El promedio y frecuencias mayores de 17 GGC en la población control ecuatoriana se ubican entre los mal altos a nivel mundial, sin embargo muchas poblaciones de EE.UU, Asia y África también registran este número de repeticiones aunque en menor frecuencia (Irvine R. , Yu, Ross, & Coetzee, 1995). Debido a que prácticamente son inexistentes los estudios de la repetición GGC relacionada al cáncer prostático en Suramérica, las frecuencias logradas en este estudio son las primeras en ser reportadas para la región. El rango en los adenocarcinomas prostáticos fue de 13 a 18

con un promedio de 16 GGC, que coincide con las poblaciones anteriormente mencionada ya sea para individuos sanos o afectados de cáncer prostático.

Los rangos y promedios de las repeticiones CAG y GGC en la población control mestiza ecuatoriana se registran en la mayoría de poblaciones a nivel mundial, pero sus frecuencias a excepción de 17GGC, tienden a tener mayor similitud con las de las poblaciones asiáticas principalmente, seguido de las poblaciones caucásicas europeas. Esto podría deberse a que la población mestiza ecuatoriana es considerada, como población trihíbrida que contienen genes originarios de América descendientes de nativos asiáticos, Europa y África al igual que en otros países latinoamericanos (González-Andrade, Sánchez, & Martínez-Jarreta, 2006).

Repeticiones CAG y GGC asociadas al cáncer prostático y variables clínico patológicas

En relación al decrecimiento de la repetición CAG entre casos y controles, se determinó asociación de riesgo en cinco categorías correspondientes a las repeticiones: ≤ 16 CAG (OR = 5,67; IC 95% = 2,56-12,58; $p < 0,001$), ≤ 18 CAG (OR = 2,95; IC 95% = 1,63 - 5,35; $p < 0,001$), ≤ 20 CAG (OR = 2,27; IC 95% = 1,35 - 3,81; $p < 0,005$), ≤ 21 CAG (OR = 2,99; IC 95% = 1,79 - 5,01; $p < 0,001$), y ≤ 22 CAG (OR = 1,86; IC 95% = 1,07-3,24; $p < 0,05$) (Tabla 7). Estos datos indican que repeticiones ≤ 22 CAG podrían conferir riesgo de desarrollar adenocarcinoma prostático en la población mestiza ecuatoriana, además que, la probabilidad de riesgo aumentaría conforme el número de repeticiones CAG decrezca, es así que, los individuos con repeticiones ≤ 22 CAG tienen 1,86 veces más probabilidades de desarrollar adenocarcinoma prostático, mientras que, en los que poseen ≤ 16 CAG la probabilidad de riesgo se incrementa a 5,67 veces (Tabla 7). Estos resultados concuerdan con otras investigaciones en las que, repeticiones ≤ 22 CAG presentan 1,65 veces más probabilidades de desarrollar esta enfermedad (Hsing, y otros, 2000), ≤ 20 CAG presentan 2 veces más probabilidades (Ingles, y otros, 1997) y en repeticiones ≤ 17 CA G la probabilidad es 3,7 veces mayor (Hakimi, Schoenberg, & Rondinelli, 1997); (Alptekin, y otros, 2012) encontraron que individuos con cáncer prostático tienden a tener alrededor de 18 repeticiones CAG, concluyendo que ≤ 18 CAG pueden estar asociada con el riesgo de adenocarcinoma de próstata e hiperplasia prostática en la población turca, aunque sin especificar de cuanto es el incremento de la probabilidad de riesgo. De igual manera, existen importantes estudios en los que no se han determinado asociación entre el número de repeticiones CAG, cáncer prostático y sus etapas avanzadas (Lange, Chen, & Brierley, 2000; Cicek, y otros, 2004; Salinas, Austin, Ostrander, & Stanford, 2005; Price, y otros, 2010); probablemente esto se deba a variaciones en el análisis de datos y principalmente a que la actividad transcripcional de este

gen está muy relacionada con factores étnicos (Campbell, Gray, Eisenberg, Ellison, & Sorenson, 2007).

Debido a esta aparente discordancia de resultados, hasta la actualidad no existen datos concluyentes acerca de si la expansión de la repetición CAG del gen receptor de andrógenos, está inversamente relacionada con el cáncer prostático o su agresividad; además no está del todo claro porque tal asociación no ha podido ser confirmada en la mayoría de estudios (Giovannucci, Is the Androgen Receptor CAG Repeat Length Significant for Prostate Cancer?, 2002). Otro punto a considerar, constituye la dificultad de comparar estos estudios debido a la falta de un modelo de análisis estándar, es así que, Giovannucci *et al.* (1997, 1999) consideraron a la repetición CAG como una variable continua comparando repeticiones ≤ 18 CAG versus repeticiones ≥ 26 CAG e Irvine *et al.* (1995) al igual que Stanford *et al.* (1997) utilizaron la mediana de 22 CAG. Por tal motivo y debido a que no existe un consenso acerca de, que número de repeticiones CAG debería ser considerado para el análisis de riesgo, en este estudio se consideraron 7 decrecimientos CAG asociados con el riesgo de cáncer prostático y para la correlación de los parámetros clínicos con el número de estas repeticiones, se consideró el método de mayor difusión en la literatura científica, que se basa en el promedio de repeticiones CAG de mayor frecuencia en poblaciones humanas y que es la comparación de ≤ 21 CAG versus ≥ 22 CAG.

Al analizar los adenocarcinomas que poseían un fenotipo mas agresivo determinado por el estadio tumoral, grado histológico de gleason, PSA , presencia de márgenes quirúrgicos positivos e invasión a vesículas seminales, los resultados sugieren que repeticiones ≤ 21 CAG podrían estar involucradas no solo con el desarrollo del cáncer prostático si no también con diagnósticos de mayor gravedad.

De los 48 individuos con estadio tumoral T2c-T4, 40(83%) presentaban ≤ 21 repeticiones CAG, relacionando a este número de trinucleótidos con la progresión a estadios tumorales graves (OR = 4,75; IC 95% = 1,77-12,72; $p < 0,005$)(Tabla 8). Esta constituye la asociación de riesgo de mayor significancia estadística encontrada hasta fecha, estos datos concuerdan con otros estudios que al relacionar ≤ 18 CAG versus ≥ 26 CAG determinaron un OR = 2,14 (IC 95% = 1,14 - 4,01) (Giovannucci, y otros, 1997), de la misma forma se estableció que ≤ 22 CAG son posibles precursores de estadios tumorales avanzados (Tsujimoto, y otros, 2004).

En relación al grado de gleason también se determinó una significativa correlación entre 21 repeticiones CAG y grados histológicos de gravedad (7-10), los trabajos que han determinado una correlación similar son escasos, ya que la mayoría independientemente del número de repeticiones CAG y la categorización histológica seleccionadas, indican que no existe suficiente evidencia para ser consideradas como parámetros predictivos (Stanford, y otros, 1997; Cerro, y otros, 1999; Platz, Leitzmann, Rifai, & otros, 2005). Esta aparente contradicción de datos posiblemente se relacione con el número de muestras o a la heterogeneidad de los factores pronósticos del cáncer prostático.

Ya que, el nivel de PSA, presencia de márgenes quirúrgicos positivos e invasión a vesículas seminales no presentaron correlación con el número de repeticiones CAG, se refuerza la teoría de que los trinucleótidos CAG no contribuyen sustancialmente en la dinámica de estos parámetros clínico-patológicos (Platz, Leitzmann, Rifai, & otros, 2005).

No se establece con claridad el efecto de la variación del número de repeticiones GGC sobre la actividad transcripcional del gen receptor de andrógenos, aunque es conocido el hecho de que estas repeticiones son menos polimórficas que las repeticiones CAG, algunos estudios sugieren que podría modular la actividad neta de la proteína (Ding, Xu, Menon, Reddy, & Barrack, 2005; Mishra, Thangaraj, Mandhani, Kumar, & otros, 2005; Krishnaswamy, Kumarasamy, Venkatesan, Shroff, & otros, 2006). Por tal motivo, no se ha podido determinar de forma concluyente la relación entre estas repeticiones y el riesgo de cáncer prostático (Irvine R. , Yu, Ross, & Coetzee, 1995; Zeegers, Kiemeny, Nieder, & Ostrer, 2004; Alptekin, y otros, 2012).

Los resultados de este trabajo no determinaron significancia estadística en ninguno de los tres decrecimientos GGC analizados, sin embargo, el ~~OR~~7 de GGC se vio substancialmente incrementado (OR = 2,5; IC 95% = 0,93 - 6,45; $p > 0,05$), por lo que en el análisis estadístico en el cual se combinan las repeticiones CAG + GGC este alelo fue decisivo para establecer los rangos a compararse, adicionalmente no se determinaron diferencias estadísticas en la distribución de este trinucleótido entre casos y controles sugiriendo que no existe relación de riesgo o protección para el cáncer prostático en la población mestiza ecuatoriana (Tabla 9). Al igual que con la repetición CAG, en este caso, la mayoría de estudios reportan que no existe asociación entre el tamaño de la repetición GGC y el riesgo de adenocarcinoma prostático (Irvine R. , Yu, Ross, & Coetzee, 1995; Cicek, y otros, 2004; Salinas, Austin, Ostrander, & Stanford, 2005), estableciendo además que no existe diferencias significativas entre casos y controles (Alptekin, y otros, 2012). Sin embargo otros autores han determinado que estas repeticiones constituyen marcadores de riesgo importantes ya que incrementan

hasta en 4,6 veces el riesgo (Hakimi, Schoenberg, & Rondinelli, 1997) y también podrían relacionarse en hombres con antecedentes familiares de este tipo de cáncer (Steinberg, Carter, Beaty, Childs, & Walsh, 1990; Narod, y otros, 1995).

Tampoco se evidenció que los tamaños de la repetición GGC constituyan factores de riesgo o protección entre los distintos parámetros clínico patológicos, y a pesar que no existieron diferencias estadísticas de la distribución de trinucleótidos entre caso graves y leves, el PSA presento un OR destacable aunque no de significancia estadística (OR = 2,18; IC 95% = 0,94 – 5,015; $p > 0,05$) (Tabla 10). El hecho de no determinar ningún tipo de asociación ya sea de riesgo o mal diagnóstico respalda las observaciones que apuntan que la actividad transcripcional del gen receptor de andrógenos no difiere en relación a los repeticiones 13-17 GGC, por lo que dentro de este rango la actividad del gen es óptima (Ding, Xu, Menon, Reddy, & Barrack, 2005).

Hasta este punto, se han estudiado las repeticiones CAG y GGC del receptor de andrógenos de forma individual ya que ambos locus se ubican en el mismo exón, sin embargo, ciertas investigaciones han reportado que la distribución de ambas repeticiones están correlacionadas y que el riesgo de desarrollar cáncer prostático se incrementa al combinar ciertos rangos (Irvine R. , Yu, Ross, & Coetzee, 1995; Stanford, y otros, 1997; Chang, y otros, 2002). En el presente estudio no se determinó que repeticiones largas CAG se relacionen con el riesgo o etapas avanzadas del cáncer prostático, por lo que se combinaron repeticiones cortas CAG con repeticiones largas y cortas GGC.

Combinaciones CAG + GGC correlacionadas al cáncer prostático y variables clínico patológicas

En la correlación ≤ 21 CAG + ≤ 16 GGC, se determinó que la distribución de ambos trinucleótidos en repeticiones cortas es independiente la una de la otra, y que no existe asociación de riesgo o protección de cáncer prostático entre casos y controles (OR = 1,82; IC 95% = 0,95 - 3,49; $p > 0,05$), de forma similar, no se encontró ninguna asociación en el análisis de las cinco variables clínico-patológicas en los adenocarcinomas (Tabla 11 y 12). En contraste, la correlación ≥ 21 CAG + ≥ 17 GGC permitió determinar una asociación estadísticamente significativa en cuanto a la distribución y una incremento de 2,42 veces, en la probabilidad de desarrollar cáncer prostático (OR = 2,42; IC 95% = 1,38 - 2,45; $p < 0,005$), en relación a las variables clínico-patológicas también se apreció un incremento en la probabilidad de presentar estadio tumoral alto (OR = 2,77; IC 95% = 1,13 – 6,79; $p < 0,05$) (Tabla 13 y 14). Estos resultados coinciden parcialmente con otros trabajos realizados por Chang y otros. (2002) además de, Salinas y otros. (2005), que analizaron las mismas combinaciones

CAG y GGC con el riesgo de cáncer prostático, mas no con sus estadios, no determinando asociación alguna. Entre los trabajos que señalan incrementos de riesgo considerables se encuentra Stamford y otros. (1997) que calculan un incremento de 2,05 veces en la probabilidad de presentar adenocarcinoma e Invine y otros (1997) también reportan dicha asociación al combinar ≤ 21 CAG + repeticiones GGC $\neq 16$ (OR = 2,1; $p < 0,08$).

Todos estos resultados con su respectivo análisis señalan que, los rangos de repetición CAG y GGC concuerdan con los estándares de la población mundial, a excepción de su frecuencia y distribución, sugiriendo que la actividad transcripcional de este gen en determinados grupos poblacionales del Ecuador, es distintos al de otras poblaciones. Estos hallazgos coinciden con otros trabajos realizados en la población ecuatoriana que han determinado que genes tales como: FQ, NF2, hMSH2, BRC-ABL, RB, CYP1A1 y SRD5A2 presentan un comportamiento diferente al de otros grupos humanos (Paz-y-Miño, y otros, 1998; Paz-y-Miño, Pérez, Burgos, Dávalos, & Leone, 1999; Paz-y-Miño & Leone, Three novel somatic mutations in the NF2 tumor suppressor gene (g816T>A; g1159A>G; gIVS11-1G>T), 2000; Paz-y-Miño, Pérez, Fiallo, & Leone, 2001; Paz-y-Miño, Arévalo, Sanchez, & Leone, 2004; Paz-y-Miño, y otros, 2009). El estudio del gen SRD5A2 y esta investigación son complementarios puesto que en ambos, se evaluó el riesgo de adenocarcinoma prostático, además la gran mayoría de muestras que conforman la población afecta y control son las mismas, llegando a determinar que el genotipo VV del SRD5A2 confiere riesgo, mientras que el genotipo LL protege a sus portadores.

Es incierto el porqué el número de repeticiones CAG y GGC han sido relacionadas con el cáncer prostático solo en determinadas investigaciones, además el hecho de que no constituyan factores de riesgo tampoco ha podido ser confirmado. Al presentar esta enfermedad una etiología tan compleja y heterogénea es necesaria una posible explicación acerca de la aparente discrepancia de estos resultados. Las diferencias étnicas en la producción de andrógenos y susceptibilidad para el cáncer de próstata podría ser las principales, tamaños de muestra, criterios para seleccionar a la población control, información patológica completa de los adenocarcinomas y la selección de los rangos de repetición para la comparación, también figuran como posibles explicaciones (Cicek, y otros, 2004).

El cáncer prostático al ser andrógeno-dependiente, ha sido tratado por terapia hormonal bloqueando la acción de las mismas y reduciendo el crecimiento neoplásico. En un inicio casi todos los pacientes responden a la terapia, pero gradualmente desarrollan resistencia, este mecanismo de

transición es un paso crítico en el avance de esta enfermedad. Por ahora se desconoce por qué ocurre esta transición, sin embargo, se piensa que el gen receptor de andrógenos es de gran relevancia (Suzuki, Ueda, Ichikawa, & Ito, 2003; Rojas, y otros, 2012). La amplificación del gen receptor de andrógenos, que se da como consecuencia de mutaciones, es un mecanismo por el cual se ha sugerido que las células del cáncer prostático son capaces de volverse sensibles a niveles más bajos de andrógenos, haciendo que la terapia de ablación de andrógenos sea ineficiente (Heinlein & Chang, 2004). Se ha observado que en el tejido prostático humano la amplificación del de este gen rara vez se presenta en los pacientes con cáncer primario que aun no han sido tratados con la terapia de ablación de andrógenos (0-5%), sin embargo, la amplificación aumenta en un 20 a 30% cuando ya han sido tratados no respondiendo a esta terapia (Al, Hurtado-Coll, & Gleave, 2003), sugiriendo que la sobreexpresión del receptor de andrógenos es más evidente conforme el cáncer es más independiente de la presencia de los andrógenos relacionando a los trinucleótidos CAG y GGC en este punto (Edwards J. , Krishna, Grigor, & Grigort, 2003), ya que la longitud de repetición CAG puede actuar como un marcador molecular para predecir la respuesta de la terapia hormonal en pacientes en estadio D de cáncer de próstata (Suzuki, y otros, 2002).

Repeticiones CAG y GGC en muestras de población indígena

En Ecuador los pueblos y nacionalidades indígenas representan el 21 % de la población (INEC, 2010), constituyendo uno de los tres principales grupos étnicos de nuestro país y cuyo aporte en el desarrollo nacional ha sido predominante (Llucó-Tixe, 2012). Sin embargo, no existen registros actuales u oficiales de cáncer prostático en poblaciones indígenas de Ecuador, por lo que la incidencia y mortalidad en estos individuos es prácticamente incierta, las graves deficiencias acerca de la salud de los pueblos indígenas ha sido reconocida particularmente en países en desarrollo (Taborda, Ferreira, Rodrigues, Stavale, & Baruzzi, 2000). Es desconocido el verdadero impacto del cáncer en general o del cáncer prostático en la población indígena pero una publicación de la ONU denuncia que en Ecuador el porcentaje de cáncer entre los indígenas que viven en zonas petroleras es treinta veces mayor que la media nacional (El Universo , 2010). Entre la escasa información concerniente al cáncer prostático en la población indígena ecuatoriana, destaca un trabajo realizado en la población indígena de la región amazónica, en el cual se determinó que, desde 1985 hasta el año 2000, de un número de 48 indígenas de sexo masculino con diagnóstico clínico de cáncer, 2 individuos el 4,2% presentaba cáncer prostático (San-Sebastián & Hurtig, 2004).

En este estudio no se registran muestras de adenocarcinoma prostático pertenecientes a indígenas, por lo que estos individuos no fueron incluidos en los análisis estadísticos para la determinación de probabilidades de riesgo, sin embargo, la determinación de genotipos en esta población fue de gran importancia para la caracterización de las repeticiones CAG y GGC en relación a variantes étnicas. Los resultados alcanzados en esta investigación constituyen los primeros registros para el continente americano, ya que, estas secuencias no han sido estudiadas en poblaciones nativas. Es así, que se determinó un rango de 18-29 repeticiones promedio 24 CAG y un rango de 14-18 con promedio 17 GGC, el promedio CAG es único de la población indígena y el GGC se presenta tanto en este grupo y en los controles. Estos promedios de repetición constituyen los registro mas alto a nivel mundial, relacionando a poblaciones nativas del Ecuador con poblaciones nativas asiáticas. Esto complementa las investigaciones que señalan que la ascendencia genética de los distintos grupos nativo americanos se originó de una migración asiática que llego a Beringia hace 15000 años, posteriormente alcanzó América hace 10000 años y se distribuyo a lo largo de todo el continente en menos de 1000 años, aproximadamente (Oppenheimer, 2003).

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

- El número de repeticiones CAG fue de 12 a 30 trinucleótidos con un promedio de 20 en los adenocarcinomas, mientras que en la población control se determinaron 16 a 30 trinucleótidos

con un promedio 22 repeticiones; las repeticiones GGC en las muestras afectas se presentaron en un número de 13 a 18 con un promedio de 16 y la población control presentó 17 a 18 trinucleótidos un promedio de 17 repeticiones.

-
- La distribución de frecuencias de la repetición CAG, exhibió diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles, determinando una asociación de riesgo de cáncer prostático a partir de repeticiones ≤ 22 ; la probabilidad de riesgo para la población mestiza ecuatoriana aumentó conforme al decrecimiento de la repetición CAG.
- La repetición GGC no mostró ser tan polimórfica como la repetición CAG, aunque se determinaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de trinucleótidos entre casos y controles, ninguno de los tres decrecimientos analizados confirió riesgo o protección para presentar cáncer prostático, por lo que no sustentan la teoría de estar relacionadas con esta patología.
- En los adenocarcinomas se demostró una correlación positiva en determinadas variables clínico-patológicas: El grado histológico de Gleason fue fuertemente relacionado con estadios tumorales altos y un incremento en los niveles séricos del PSA preoperatorio, además la invasión a las vesículas seminales fue a fin con estadios tumorales altos y estos a su vez con el PSA, lo que evidencia que entre mas indiferenciado histológicamente este el tumor la extensión tumoral aumenta y los resultados de supervivencia empeoran , caracterizando al grado de Gleason y al estadio tumoral como los marcadores pronósticos mas significativos del cáncer prostático.
- Al relacionar repeticiones CAG ≤ 21 trinucleótidos con las variables clínico -patológicas de las piezas tumorales, se descubrió que, las repeticiones en este rango están fuertemente relacionadas con estadios tumorales y niveles de gleason altos, los resultados obtenidos fueron estadísticamente significativos relacionando a las repeticiones cortas CAG con etapas agresivas de esta enfermedad y peores diagnósticos.
- La distribución GGC no presentó diferencias estadísticamente significativas al relacionar la repetición ≤ 16 GGC con las variables clínicos -patológicas, no existe relación de riesgo o

protección, en consecuencia este trinucleótido al ser analizado de forma independiente no aportó información relacionada con el comportamiento biológico del tumor.

- La combinación ≤ 21 CAG + ≤ 16 GGC demostró, que no existe una asociación de riesgo o diferencias estadísticamente significativas al ser comparadas con el resto de frecuencias sobrantes, de igual manera no pudieron ser relacionadas con las variables clínicas. Para contrastar estos resultados, la combinación ≤ 21 CAG + ≥ 17 GGC confirmó un riesgo considerable de presentar cáncer prostático y en relación a los adenocarcinomas estos genotipos aumentaron las probabilidades de ser coligados con estadios tumorales superiores a T2b.
- La caracterización molecular de las repeticiones CAG y GGC en una muestra de la población indígena del Ecuador, constituye un valioso aporte para descifrar ciertos aspectos de la complicada actividad transcripcional del receptor de andrógenos ligada a la variación étnica. Estas secuencias no han sido estudiadas en poblaciones nativas americanas, por lo que, los promedios de 24 CAG y 17 GGC son los mas altos reportados a nivel mundial y relacionan a la población indígena ecuatoriana con poblaciones asiáticas.
- De las secuencias genotipadas, los sitios variables o polimórficos correspondieron exclusivamente al número de repeticiones CAG o GGC, no se detectó ningún otro tipo de variante, la evidencia molecular observada indica una considerable heterogeneidad genética en relación al número de trinucleótidos y una alta homogeneidad en el resto de las secuencias amplificadas.

RECOMENDACIONES

- La información proporcionada por la caracterización de las repeticiones polimórficas CAG y GGC debe ser interpretada con precaución; a pesar de los resultados estadísticamente significativos y relevantes, el número de trinucleótidos asociados con el cáncer prostático y con las variables clínicas, no constituyen evidencia definitiva para ser consideradas como marcadores moleculares de riesgo, diagnóstico o mal pronóstico oncológico.

- Si bien, existen perfiles genéticos de riesgo basados en este tipo de secuencias, los hallazgos de esta investigación para el desarrollo de estos marcadores por ahora son preliminares. Debido a que el cáncer manifiesta complejas interacciones poligénicas, son especialmente recomendados el análisis de otros genes vinculados con la biosíntesis de andrógenos, con receptores hormonales prostáticos o relacionados con la apoptosis, tales como el PSA, CYP17, HSD3B, repeticiones GGN(AR), GSTP1, HPC1, entre otros.
- La heterogeneidad que presenta la población ecuatoriana, como resultado de contribuciones genéticas provenientes de distintas regiones del mundo, resalta la necesidad de caracterizar secuencias de longitud polimórfica relacionadas con procesos patológicos y variación étnica, para esto, es necesario la inclusión de diversos grupos humanos acordes con la diversidad poblacional de nuestro país. El análisis de afroecuatorianos es primordial en este tipo de estudio, ya que presentan los índices más altos de incidencia y mortalidad.
- Una importante limitante para el desarrollo de este trabajo fue los escasos datos estadísticos sobre el cáncer en función de la variación étnica, la mayoría de registros se centra en zonas geográficas relacionadas con la ubicación de centros hospitalarios. Es necesario que esta información forme parte del Registro Nacional de Tumores para determinar el verdadero potencial de marcadores moleculares de diagnóstico o tratamiento de cáncer en la población ecuatoriana.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Instituto Nacional de Cancerología ESE. (2004). *El cáncer aspectos básicos sobre su biología clínica, prevención, diagnóstico y tratamiento*. Bogotá: Ministerio de la Protección Social Colombia.
- Registro Nacional de Tumores. (2009). *Epidemiología del cáncer en Quito* (Vol. 14). Quito: SOLCA.

- abcmedico.com. (23 de agosto de 2012). Obtenido de antígeno prostático:
http://www.tuotromedico.com/temas/antigeno_prostata.htm
- Abrahamsson, P. A., & Bostwick, D. (2000). The biological nature of cancer-a basis for new treatment approaches. *Guidelines in the Organization of Swedish Urology*, 1-33.
- Al, S., Hurtado-Coll, A., & Gleave, M. (2003). Androgens and prostate cancer. *World Journal of Urology*(21), 325-337.
- Alptekin, D., Izmirli, M., Bayazit, Y., Luleyap, H., Yilmaz, M., Soyupak, B., . . . Tansug, Z. (2012). Evaluation of the effects of androgen receptor gene trinucleotide repeats and prostate-specific antigen gene polymorphisms on prostate cancer. *Genetics and Molecular Research*, 2(11), 1424-1432.
- American Society of Clinical Oncology. (28 de junio de 2010). *Cancer.net*. Obtenido de www.asco.org
- Arboleda, H. (2004). Las mutaciones dinámicas y las enfermedades neurológicas. *Actas Neurologicas Colombianas*, 3-4.
- ASCO. (2010). *Guía del cáncer de próstata*. Los Angeles: AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY.
- atlasgeneticsoncology. (august de 2012). *Transcription factor* . Obtenido de Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology:
http://atlasgeneticsoncology.org/Categories/Transcription_factor.html
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., & Struhl, K. (1995). *Short Protocols in Molecular Biology*. California: John Wiley & Sons, Inc.
- Baniahmad, A., Leng, X., & Burris, T. (1995). The T4 activation domain of the thyroid hormone receptor is required to release a corepressor necessary for silencing. *Molecular Cell Biology*(15), 76-86.
- Beato, M., Truss, M., & Schuz, G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*, 83, 851-857.
- Beilin, J., Harewood, L., Frydenberg, M., Mameghan, H., Martyres, R., Farish, S., . . . Zajac, J. (2001). A Case-Control Study of the Androgen receptor Gene CAG repeat polymorphism in Australian prostate Carcinoma Subjects. *Cancer*, 941-949.
- Bellmunt, J., Rosenberg, J., & Choueiri, T. (october de 2009). Recent progress and pitfalls in testing novel agents in castration-resistant. *European Urology*, 4(56), 606-608.
- Binnie, M., Freda, E., Heald, C., & Fouad, K. (Junio de 2005). Polymorphic forms of prostate antigen and their interaction with androgen receptor trinucleotide repeats in prostate cancer. *Cancer*, 63(4), 309-3015.

- Biolchi, V., Neto, B., Koff, W., & Simoni, I. (2012). Androgen receptor CAG polymorphism and the risk of benign prostatic hyperplasia in a Brazilian population. *Int Brazilian Journal of Urology*(38), 373-379.
- Bostwick, D. (2004). Human prostate cancer risk factors. *Cancer supplement*, 356-359.
- Bostwick, D., Grignon, D., Hammond, E., Amin, M., Cohen, M., & Crawford, D. (1999). Prognostic factors in prostate cancer: College of American Pathologist consensus statement. *Pathology Lab Medical*, 194, 995-1000.
- Brandan, N., Juaristi, J., Aguirre, V., & Romero- Benítez, M. (2002). *Oncogenes y genes supresores de tumores*. México: Universitaria.
- Brive, L., Agus, D., & Ely, K. (2001). Structure Based Androgen Receptor Gene Mutation Database: A tool to link molecular location and receptor function. *The prostate journal*, 76-91.
- Brooks, B., Paulson, H., Merry, D., Salazar-Grueso, E., Brinkmann, A., Wilson, E., & Fischbeck, K. (1997). Characterization of an expanded glutamine repeat androgen receptor in a neuronal cell culture system. *Neurobiology*, 313–323.
- Campbell, B., Gray, P., Eisenberg, D., Ellison, P., & Sorenson, M. (2007). Androgen receptor CAG repeats and body composition among Ariaal men. *international journal of andrology*(32), 140–148.
- Cerro, L., Wöhr, G., Häussler, J., Berthon, P., Drelon, E., Mangin, P., . . . Vogel, W. (1999). (CAG)nCAA and GGN repeats in the human androgen receptor gene are not associated with prostate cancer in a French–German population. *European Journal of Human Genetics*(7), 357–362.
- Chan, V. (1992). Extraction of nucleic acids from clinical samples and cultured cells. En: Diagnostic Molecular Pathology. *A practical Approach II*, 1–23.
- Chang, B., Zheng, S., Hawkins, G., Isaacs, S., Wiley, K., Turner, A., . . . Meyers , D. (2002). Polymorphic GGC repeats in the androgen receptor gene are associated with hereditary and sporadic prostate cancer risk. *Hum Genet*(110), 122–129.
- Choong, C. S., Kemppanien, J. A., Zhou, Z., & Wilson, E. (1996). Reduced androgen receptor gene expression with first exon CAG repeat expansion. *Molecular Endocrinology*(10), 1527-1535.
- Choong, C., Kemppanien, J., & Zhou, Z. (1996). Reduced androgen receptor gene expression with first exon CAG repeat expansion. *Molecular Endocrinology*, 10, 1527-1535.
- Cicek, M., Conti, D., Curran, A., Neville, P., Paris, P., Casey, G., & Witte, J. (2004). Association of ProstateCancer Risk and Aggressiveness toAndrogen PathwayGenes:SRD5A2,CYP17, andthe AR. *The Prostate*(59), 69 -76.
- Corral, F., Cueva, P., & Yopez, J. (2004). *Epidemiología del Cáncer en Quito y en otras regiones del Ecuador*. Quito: Registro Nacional de Tumores.

- Cossmán, J. (1990). *Molecular Genetics in Cancer Diagnosis*. Elsevier Science Publishers, 117-123.
- Cuenca, P., & Morales, F. (1999). Mutaciones inestables, causa de algunas enfermedades neurológicas hereditarias. *Actas Médicas de Costa Rica*(41), 7-15.
- D'Amico, A., Renshaw, A., Sussman, B., & Chen, M. (2005). Pretreatment PSA velocity and risk of death from prostate cancer following external beam radiation therapy. *JAMA*, 4(294), 440-447.
- Davis-Dao, C., Tuazon, E., Sokol, R., & Cortesiss, B. (2007). Male Infertility and Variation in CAG Repeat Length in the Androgen Receptor Gene: A Meta-analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* , 4319-4326.
- Dawson, N., & McLeod, D. (1997). The assessment of treatment outcomes in metastatic prostate cancer: changing endpoints. *European Journal of Cancer*, 4(33), 560-565.
- Dearnley, D. (1994). Current issues in cáncer- Cáncer of the prostate. *Medical Journal*(308), 780-784.
- Debras, B., Guillonneau, B., Bougaran, J., Chambon, E., & Vallancien, G. (1998). Prognostic significance of seminal vesicle invasion on the radical prostatectomy specimen. Rationale for seminal vesicle biopsies. *Eropean Urology*, 3(33), 271-277.
- Dehm, S. M., & Tindal, D. J. (2007). Androgen receptor structural and functional elements: role and regulation in prostate cancer. *Molecular Endocrinology*(21), 2855-2863.
- Denmeade, S., & Isaacs, J. (15 de January de 2004). Development of prostate cancer treatment: The good news. *The Prostate*, 58(3), 211-224.
- Derweesh, I., Kupelian, P., Zippe, C., Levin, H., Brainard, J., & Magi-Galluzi, C. (2004). Continuing trends in pathological stage migration in radical prostatectomy specimens. *Uroogyl Oncology*, 22, 300-306.
- Devlin, T. (1999). *Bioquímica* (3 ed.). Madrid: Reverté.
- Ding, D., Xu, L., Menon, M., Reddy, G., & Barrack, E. (2005). Effect of GGC (Glycine) Repeat Length Polymorphism in the Human Androgen Receptor on Androgen Action. *The Prostate* (62), 133-139.
- Djavan, B., Kadesky, K., & Klopukh, B. (1999). Las puntuaciones de Gleason obtenidas en biopsia por punción muestran poca correlación con la pieza de prostatectomía radical. *European Urology*, 6, 369-372.
- Edwards, A., Hammond, H. A., Jin, L., Caskey, C. T., & Chakraborty, R. (1992). Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomics*, 241-253.
- Edwards, J., Krishna, N. S., Grigor, K. M., & Bartlett, J. M. (2003). Androgen receptor gene amplification and protein expression in hormone refractory prostate cancer. *British Journal of Cancer*(89), 552-556.

- Edwards, J., Krishna, N., Grigor, K., & Grigort, J. (2003). Androgen receptor gene amplification and protein expression in hormone refractory prostate cancer. *British Journal of Cancer*(89), 552-556.
- Edwards, S., Badzioch, M., Minter, R., Hamoudi, R., Collins, N., Ardern-Jones, A., . . . Eeles, R. (1999). Androgen receptor polymorphisms: Association with prostate cancer risk, relapse, and overall survival. *Int J Cancer*(84), 458–465.
- El diario. (4 de febrero de 2012). <http://www.eldiario.com.ec>. Obtenido de <http://www.eldiario.com.ec/noticias-manabi-ecuador/219147-solca-detecta-mil-casos-de-cancer-cada-ano/>
- El Universo . (jueves de Enero de 2010). *El Universo Salud*. Obtenido de ONU revela alto porcentaje de cáncer en indígenas de zonas petroleras: <http://www.eluniverso.com/2010/01/14/1/1384/onu-revela-alto-porcentaje-cancer-indigenas-zonas-petroleras.html>
- Epstein, J., Carmichael, M., & Walsh, P. (1993). Adenocarcinoma of the prostate invading the seminal vesicle: definition and relation of tumor volume, grade and margins of resection to prognosis. *Journal Urology*, 5(149), 1040-1045.
- Esteban, E., Rodon, N., Via, M., Gonzalez-Perez, E., Santamaria, J., Dugoujon, J., . . . Moral, P. (2006). Androgen receptor CAG and GGC polymorphisms in Mediterraneans: repeat dynamics and population relationships. *Journal Human Genetics*(51), 129–136.
- Ferlin, A., Garolla, A., Bettella, A., Bartolini, L., Roverato, C., & Foresta, C. (2005). Androgen receptor gene CAG and GGC repeat in cryptorchidism. *European Journal of Endocrinol.*, 419-425.
- Figueroa, C. (2008). *Cáncer*. Baja California: Universidad de Baja California.
- Freedland, S., Aronson, W., Presti, J., Amling, C., Terris, M., & Trock, B. (2004). Predictors of prostate-specific antigen progression among men with seminal vesicle invasion at the time of radical prostatectomy. *Cancer*, 8(100), 1633-1638.
- Fu, H., Kulh, A., Pizutti, M., Pieretti, J., Sutcliffe, S., & Richards, A. (1991). Variation of the CGG repeat at the fragile X site. *Results in genetic instability*, 1047-1058.
- Giovannucci, E. (Octubre de 2002). Is the Androgen Receptor CAG Repeat Length Significant for Prostate Cancer? *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 11, 985–986.
- Giovannucci, E., Stampfer, M., Krithivas, K., Brown, Brufsky, A., Talcott, J., . . . Kantoff, P. (April de 1997). The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 94, 3320–3323.
- Giovannucci, E., Stampfer, M., Kritivas, K., Brown, M., Dahl, D., Brufsky, A., . . . Kantoff, P. (1997). The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Prostate*, 7(94), 3320-3323.

- GLOBOCAN. (23 de October de 2008). *Estimated number of new prostate cancer cases and deaths by world area, 2008*. Obtenido de <http://globocan.iarc.fr/>
- GLOBOCAN. (2008). *WWW.globocan.iarc*. Obtenido de <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/prostate.asp>
- González-Andrade, F., Sánchez, D., & Martínez-Jarreta, B. (2006). EL MESTIZAJE GENÉTICO EN ECUADOR Y SU APLICACIÓN MÉDICO FORENSE. *Ciencia Forense*(8), 133-154.
- Gusella, J., Wexler, N., Conneally, P., Naylor, S., Anderson, M., & Tanzi, F. (1983). A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's. *Nature*, 234-238.
- Hakimi, J., Schoenberg, M., & Rondinelli, R. (1997). Androgen receptor variants with short glutamine or glycine repeats may identify unique subpopulations of men with prostate cancer. *Clin Cancer Research*(3), 599–1608.
- Halvorsen, O., Haukaas, S., Hoisaeter, P., & Akslen, L. (2000). Independent prognostic importance of microvessel density in clinically localized prostate cancer. *Anticancer Research*, 5(20), 3791-9.
- Harber, D. (2001). *Molecular Genetics of Cancer*. Los angeles: Scientific American Medicine.
- Heemers, H. V., & Tindall, D. J. (2007). Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev*(28), 778-808.
- Heinlein, C. A., & Chang, C. (2004). Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev*, 276-308.
- Heinlein, C., & Chang, C. (2004). Androgen receptor in prostate cancer. *Endocr Rev*(25), 276-308.
- Hsing, A., Gao, Y. T., Wu, G., Wang, X., Deng, J., Chen, Y., . . . Chang, C. (15 de September de 2000). Polymorphic CAG and GGN Repeat Lengths in the Androgen Receptor Gene and Prostate Cancer Risk: A Population-based Case-Control Study in China. *CANCER RESEARCH* (60), 5111–5116.
- Hughes, C., Murphy, A., Martin, C., & Sheils, O. (2005). Molecular pathology of prostate cancer. *Journal of clinical Pathology*, 58, 73-684.
- Humphrey, P. A. (2004). Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Modern Pathology*, 292-306.
- Humphrey, P. A. (2004). Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Modern Pathology*(17), 292–306.
- INEC. (2010). *Censo de poblacion y Vivienda* . Quito: INEC Instituto Nacional de Estadísticas y Censos.
- INEC. (2010). *Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, Anuario de Estadísticas Vitales: Nacimientos y Defunciones. Año 2010*. Obtenido de

http://www.inec.gob.ec/estadisticas/index.php?option=com_remository&Itemid=&func=startdown&id=156&lang=es&TB_iframe=true&height=250&width=800

- Ingles, S., Ross, R., Yu, M., Irvine, R., La Pera, G., Haile, R., & Coetzee, G. (1997). Association of prostate cancer risk with genetic polymorphisms in vitamin D receptor and androgen receptor. *Journal Natl Cancer Institute*(89), 166–170.
- Ingles, S., Yu, M., Irvine, R., La Pera, G., Haile, R., & Coetzee, G. (1997). Association of prostate cancer risk with genetic polimorphims in vitamin D receptor and androgen receptor. *Journal of National Cancer Institute*, 166-170.
- International World Cancer Research Foundation. (2008). Obtenido de Cancer facts & figures - Prostate cancer worldwide: http://www.wcrf.org/cancer_facts/prostate-cancer-worldwide.php
- invitrogen. (2007). *User Manual Catalog PureLink Genomic DNA kits*. invitrogen corporation.
- Irvine, R., Yu, M., Ross, R., & Coetzee, G. (May de 1995). The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. *CANCER RESEARCH*(55), 1937-1940.
- Irvine, R., Yu, M., Ross, R., & Coetzee, G. (1995). The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are linkage disequilibrium in men with prostate cancer. *Cancer Research*, 59(9), 1937-1940.
- Izquierdo, M. (1999). *Ingeniería genética y transferencia génica*. Pirámide.
- Jhaveri, F., Klein, E., Kupelian, P., Zippe, C., & Levin, H. (1999). Declining rates of extracapsular extension after radical prostatectomy: Evidence for continued stage migration. *Journal of Clinical Oncology*, 10(17), 3167-3172.
- Kittles, R., Young, D., & Weinrich, S. (2001). Extent of linkage disequilibrium between the androgen receptor gene CAG and GGC repeats in human populations: Implications for prostate cancer risk. *Hum Genet*, 109, 253-261.
- Krausz, C. (March de 2012). An Encore for the Repeats: New Insights into an Old Genetic Variant. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, 97(3), 764–767.
- Krishnaswamy, V., Kumarasamy, T., Venkatesan, V., Shroff, S., & otros. (2006). South Indian men with reduced CAG repeat length in the androgen receptor gene have an increased risk of prostate cancer. *Journal of Human Genetic*(51), 254-257.
- Lange, E., Chen, H., & Brierley, K. (2000). The polymorphic exon 1 androgen receptor CAG repeat in men with a potential inherited predisposition to prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*(9), 439–42.
- Lantigua, A. (1997). Síndrome frágil X: Mutaciones dinámicas y su repercusión en otras enfermedades genéticas. *Revista Cubana de Pediatría*, 37-47.

- Lara, A., Déniz, F., Ruíz, A., Pinar, B., & Sáez-Bravo, M. (2004). cáncer de próstata. *Biocáncer*(1), 1-12.
- Larra, P., Déniz, F., Ruíz, A., Pinar, B., & Sáez-Bravo, M. (2004). Cáncer de próstata. *Biocáncer*, 1-12.
- Lewin, B. (2001). *Genes*. Oxford: Oxford University Press.
- Lilja, H., & Christensson, A. (1999). The prognostic value of different forms of prostate specific antigen and their ratios in patients with prostate cancer. *British Journal Urology*, 9(84), 1021-7.
- Lluco-Tixe, M. (10 de 08 de 2012). *Proceso histórico del movimiento indígena ecuatoriano*. Obtenido de <http://icci.nativeweb.org/elecciones2000/lluco.html>
- Luke, M. C., & Coffey, D. S. (1994). The male sex accessory tissues. Structure, androgen action, and physiology. In *The physiology of reproduction*. En E. Knobil, & J. D. Neil. New York: Raven Press.
- Luque, J., & Hernandez, A. (2001). Current prostate cancer: 20 years later. *British Journal of Urology International*, 2(100), 11-14.
- Lylli. (27 de septiembre de 2011). *Definición de los estadios de los tumores malignos sólidos*. Obtenido de <https://www.lilly.es/PRENSA/medical/cancer/archivos/7.%20TUMORES%20MALGNOS%20SOLIDOS.pdf>
- Malcom, A. (2001). *Cancer*. Imperial College School of Medicine. Nature Publishing Group.
- Manak, M. M. (1993). Sample Preparation. *DNA probes* (G.H. Keller y M.M. Manak, eds) , 27-68.
- Marberger, M. (2007). Current prostate Cancer: 20 years later. *British Journal of Urology International*, 2, 11-14.
- Mishra, D., Thangaraj, K., Mandhani, A., Kumar, A., & otros. (2005). Is reduced CAG repeat length in androgen receptor gene associated with risk of prostate cancer in Indian population? *Clinical Genetic*(68), 55-60.
- Morrel, V. (1993). The puzzle of the triple repeats. *Science*, 260, 1422-1423.
- Muñoz, A. (1997). *Genes y nuevas Terapias*. Madrid: Elice.
- Muñoz, A. (1997). *Genes y nuevas Terapias*. Madrid: Elice.
- Nagashima, T., Hirose, K., & al, e. (1998). Familiar bulbo-spinal muscula atrophy associated with testicular atrophy and sensory neuropathy: autopsy case report of two brothers. *Journal neurology Science*, 87, 141-152.

- Narain, V., Bianco, F., Grignon, D., Sakr, W., Pontes, J., & Wood, D. (2001). How accurately does prostate biopsy Gleason score predict pathologic findings and disease free survival? *Prostate*(49), 185-190.
- Narod, S., Cusan, D., Diammond, P., Gomez, J., Suburu, R., & Labrie, F. (1995). The impact of family history on early detection of prostate cancer. *Nat Med*(2), 99-101.
- National Cancer Institute. (04 de september de 2010). *National Cancer Institute -prostate cancer*. Obtenido de <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/prostate>
- NCBI. (12 de february de 2012). *Homo sapiens androgen receptor (AR)*. Obtenido de [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/21322251?report=genbank&log\\$=nucltop&blast_rank=1&RID=4G0GNG6R01N](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/21322251?report=genbank&log$=nucltop&blast_rank=1&RID=4G0GNG6R01N)
- Newton, C. R., & Graham, A. (1994). *PCR*. Oxford, UK: Bios Scientific Publishers.
- Ntais, C., Polycarpau, A., & Tsatsoulis, A. (2003). Molecular epidemiology of prostate cancer: androgens and polymorphisms in androgen-related genes. *European journal of Endocrinology*(149), 469-477.
- Nussbaum, R., McInnes, R., & Willard, H. (2001). *Genetics in Medicine* (6 ed.). Philadelphia: Saunders.
- Oppenheimer, S. (2003). *Los senderos del edén Orígenes y evolución de la especie humana*. Madrid: Crítica.
- Pallarés, J. (2004). Tesis Doctoral. *Expresión de los factores angiogénicos VEGF y bFGF, y de los receptores Flt-1 y FLK/KDR en la neoplasia intraepitelial prostática*. Barcelona, España.
- Partin, A., & Coffey, D. (1998). The prostate and seminal vesicles. *Campbell's Urology*, 1381-1419.
- Paz-y-Miño, C., & Leone, P. (2000). Three novel somatic mutations in the NF2 tumor suppressor gene (g816T>A; g1159A>G; gIVS11-1G>T). *Human Mutation*, 5(15), 487.
- Paz-y-Miño, C., & Leone, P. E. (2002). Técnicas utilizadas en el análisis de mutagenicidad y carcinogénesis . En A. C. C. Paz-y-Miño. Quito: Edición del Laboratorio de Genética Molecular y Citogenética Humana.
- Paz-y-Miño, C., Arévalo, M., Sanchez, M., & Leone, P. (2004). Chromosome and DNA damage analysis in individuals occupationally exposed to pesticides with relation to genetic polymorphism for CYP 1A1 gene in Ecuador. *Mutation Research*(562), 77-89.
- Paz-y-Miño, C., Burgos, R., Morillo, S., Santos, F., Fiallo, F., & Leone, P. (1998). BCR-ABL rearrangement frequencies in CML and ALL in Ecuador, South America. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 132, 65-67.
- Paz-y-Miño, C., Pérez, J., Burgos, R., Dávalos, M., & Leone, P. (1999). The ΔF508 mutation in Ecuador, South America. *Human Mutation*, 14, 348-350.

- Paz-y-Miño, C., Pérez, J., Fiallo, B., & Leone, P. (2001). A polymorphism in the hMSH2 gene (gIVS12-6T>C) associated with non-Hodgkin lymphomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics*(133), 29–33.
- Paz-y-Miño, C., Perez, J., Morillo, S., Santos, J., Fiallo, F., & Leone, P. (2002). A polymorphism in the hMSH2 gene (gIVS12-6T-C) associated with non-Hodgkin lymphomas. *Cancer Genetics and Cytogenetics*(29-33), 29-33.
- Paz-y-Miño, C., Witte, T., Robles, P. C., Llumipanta, W., Díaz, M., & Arévalo, M. (2009). Association among polymorphisms in the steroid 5a-reductase type II (SRD5A2) gene, prostate cancer risk, and pathologic characteristics of (SRD5A2) gene, prostate cancer risk, and pathologic characteristics of prostate tumors in an Ecuadorian population. *Cancer Genetics and Cytogenetics*(189), 71-76.
- Peñuelas, I., de-Miguel, C., & Gullón, A. (1997). Expansión de tripletes repetidos en enfermedades neurodegenerativas hereditarias. *Medicina Clinica*, 542-548.
- Pierce, B. (2006). *Genética: Un enfoque conceptual* (2 ed.). Madrid: Medica Panamericana.
- Platz, E. A., Giovannucci, E., Dahl, D. M., Krithivas, K., Hennekens, C., Brown, M., . . . Kantoff, P. W. (1998). The androgen receptor gene GGN microsatellite and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 379-384.
- Platz, E., Leitzmann, M., Rifai, N., & otros. (Mayo de 2005). Sex Steroid Hormones and the Androgen Receptor Gene CAG Repeat and Subsequent Risk of Prostate Cancer in the Prostate-Specific Antigen Era. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention*(14), 1262-1269.
- Postma, R., & Schröder, F. H. (2005). Screening for prostate cancer. *European Journal of Cancer*, 825-833.
- Potaman, V., Bissler, V., Hashem, E., Oussatcheva, L., Luda, S., Shlyakhtenko, Y., & Lyubchenko, T. (2003). Unpaired structures in SCA 10 (ATTCT)_n.(AGAAT)_n Repeats. *Journal of Molecular Biology*(326), 1095-1111.
- Price, D., Chau, C., Goodman, P., Baum, C., Ockers, S., English, B., . . . Thompson, I. (October de 2010). Androgen receptor CAG repeat length and association with prostate cancer risk: results from the prostate cancer prevention trial. *Journal Urology*, 6(184), 2297-3302.
- Promega Corporation. (1999). *Wizard® Genomic DNA Purification Kit Technical Manual*. Promega Corporation. Madison: USA.
- Prostate Cancer Foundation of Australia. (28 de Junio de 2012). *Prostate Cancer Statistics*. Obtenido de <http://www.prostate.org.au/articleLive/>:
<http://www.prostate.org.au/articleLive/pages/Prostate-Cancer-Statistics.html>
- Raya, J. (2006). Las bases moleculares del cáncer. *Cáncer* (págs. 40-49). Guanajuato: Universidad Autonoma del Estado de México.

- Reinolds, M., Kastury, K., Groskopf, J., Scahlken, J., & Rittenhouse, H. (2007). Molecular Markers for prostate cancer. *Cancer lett*, 249, 5-13.
- Ribeiro, M., Santos, A., Carvalho-Salles, A., & Hackel, C. (2002). Allelic frequencies of six polymorphic markers for risk of prostate cancer. *Brazilian Journal of Medical and Biological research*, 35, 205-213.
- Richter, E., Srivastava, S., & Dobi, A. (2007). Androgen receptor and prostate cancer . *Prostate cancer and prostatic diseases*, 114-118.
- Rojas, F., Manzo, J., Heriberto, A., Aranda-Abreu, G., Juárez, E., Alfonso, G., . . . Hernández, M. (20 de 08 de 2012). *El receptor a andrógenos en la fisiopatología prostática*. Obtenido de <http://www.uv.mx/eneurobiologia/vols/2011/4/Rojas-et al/HTML.html>
- Ross, R. K., Coetzee, G. A., Reichardt, J., Yu, M. C., Feilgenson, H., Stanczy, F., . . . Henderson, B. (1995). Does the racial-ethnic variation in prostate cancer risk have a hormonal basis? *Cancer Supplement*, 1778-1782.
- Salinas, C., Austin, M., Ostrander, E., & Stanford, J. (2005). Polymorphisms in the Androgen Receptor and the Prostate-Specific Antigen Genes and Prostate Cancer. *The Prostate*, 65, 58-65.
- Sánchez, D., Rosell, C., Rioja, Z., Regolo, J., Fernández, J., López, J., . . . Berián, P. (2004). MUTACIONES DEL GEN DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EN PACIENTES CON ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA CLÍNICAMENTE LOCALIZADO. *Actas Urológicas Españolas*, 221-229.
- San-Sebastián, M., & Hurtig, A. (2004). Cancer among indigenous people in the Amazon basin of Ecuador, 1985–2000. *Rev Panam Salud Publica*, 16(5), 328-333.
- Sartor, O., Zheng, Q., & Eastham, J. (1999). Androgen receptor gene CAG repeat length varies in a race-specific fashion in men without prostate cancer. *Urology*, 53, 378-380.
- Sartorius, C. A., Melvilla, L. Y., & Holvlad, A. R. (1994). A third transactivation function of human progesterone receptors located in the unique N-terminal segment of the B-isoform. *Molecular Endocrinology*(84), 1347-1360.
- Scaglia, J. (2008). *Receptor de andrógenos en la función gonadal masculina y femenina*. Obtenido de Sociedad argentina de endocrinología: <http://www.raem.org.ar/resumen.asp?id=457>
- Scherr, D., Swindle, P., & Scardino, P. (2003). National Comprehensive Cancer Network Guidelines for the Management of Prostate Cancer. *Urology Supplement*(61), 14-24.
- Segarra, J., Millán, F., Palou, J., & Villavicencio, H. (2006). Factores pronósticos y tablas predictivas del cáncer de próstata clínicamente localizado. *Actas urológicas españolas*, 567-573.
- Segarra, J., Millán, F., Palou, J., & Villavicencio, H. (2006). Factores pronósticos y tablas predictivas del cáncer de próstata clínicamente localizado. *Actas Urológicas Españolas*, 6(30), 567-573.

- Sim, H. G., & Cheng, C. W. (2005). Changing demography of prostate cancer in Asia. *European Journal of Cancer*(41), 834-845.
- Small, E., Prins, E., & Taplin, M. (1999). The Androgen receptor and the physiology and endocrinology of the prostate. *Comprehensive textbook of Genitourinary oncology*, 565-585.
- Smith, C., Bauer, J., Conelly, R., Seay, T., Kane, C., Foley, J., . . . Moul, J. (2000). Prostate cancer in men age 50 years or younger. a review of the department of defense center for prostate disease research multicenter prostate cancer database. *Journal of Urology*, 164, 1964-1967.
- So, A., Hurtado-Coll, A., & Gleave, M. E. (2003). Androgens and prostate cancer. *World J Urol*(21), 325-337.
- Sobin, L., Gospodarowicz, M., & Wittekind, C. (2009). TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer. 7th edn. *Wiley-Blackwell* , 243-248.
- Stamey, T., Caldwell, M., Mcneal, J., Molloy, R., Hernandez, M., & Downs, J. (2002). The Prostate Specific Antigen era in the United States is over for Prostate Cancer: What happened in the last 20 years? *Journal Urology*, 172, 1297-1301.
- Stanford, J., Just, J., & Gibas, M. (1997). Polymorphic repeats in the androgen receptor gene. *Cancer Research*, 57, 1194-1198.
- Stanford, J., Just, J., Gibbs, M., Wicklund, K., Neal, C., Blumenstein, B., & Ostrander, E. (1997). Polymorphic repeats in the androgen receptor gene: Molecular markers of prostate cancer risk. *Cancer Research*, 6(57), 1194-1198.
- Steinberg, G., Carter, B., Beaty, T., Childs, B., & Walsh, P. (1990). Family history and the risk of prostate cancer. *Prostate*, 17, 337-347.
- Suzuki, H., Akakura, K., Komiya, A., Ueda, T., Imamoto, T., Furuya, Y., . . . Ito, H. (2002). CAG polymorphic repeat lengths in androgen receptor gene among Japanese prostate cancer patients: Potential predictor of prognosis after endocrine therapy. *The prostate*(51), 219-224.
- Suzuki, H., Ueda, T., Ichikawa, T., & Ito, H. (2003). Androgen receptor involvement in the progression of prostate cancer. *Endocrine-Related Cancer*(10), 209–216.
- Taborda, W., Ferreira, S., Rodrigues, D., Stavale, J., & Baruzzi, R. (2000). Rastreamento do câncer de colo uterino em índias do Parque Indígena do Xingu, Brasil central. *Rev Panam*, 7(2), 92–96.
- Tannenbaun, M. (1977). Urologic Pathology. *The prostate*, 171-198.
- Tapia, O., Bellolio, J., Roas, J., Guzmán, P., Villaseca, M., & Araya, J. (2011). Puntaje de Gleason en cáncer de próstata:Correlación de la biopsia por punción y prostatectomía radical. *Revista medica de Chile*, 139, 171-176.
- Taplin, M. E., & Ho, S. M. (2001). The endocrinology of prostate cancer. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism Clinical review*, 134, 3467-3477.

- Taplin, M. E., Bubley, G. J., Shuster, T. D., & otros. (1995). Mutations of the androgen receptor gene in metastatic androgen independent prostate cancer. *N.Engl.Journal of medicine*, 1393-1398.
- Thompson, I. A., Tangen, C. M., Tolcher, A., Crawford, E. D., Eisenberger, M., & Moinpour, C. M. (2001). Association of African-American ethnic background with survival in men with metastatic prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 93(3), 219–225.
- Thompson, M., Maclannes, R., & Willard, H. (1996). *Genética en Medicina*. Barcelona: Masson.
- Thompson, M., McInnes, R., & Willard, H. (1991). *Genetics* (Vol. 5). Philadelphia: Saunders Compañy.
- Torres, A., & Baca, B. (1995). Reacción en cadena de la polimerasa. *Elementos*, 3(23), 16-21.
- Tsujimoto, Y., Takakuwa, T., Takayama, H., Nishimura, K., Okuyama, A., Aozasa, K., & Nonomura, N. (2004). In Situ Shortening of CAG Repeat Length Within the Androgen Receptor Gene in Prostatic Cancer and its Possible Precursors. *The Prostate*, 58, 283 - 290.
- Uribe, A. (2004). Cáncer de Próstata, aproximación a un modelo genético y molecular. *Actas Urológicas de Colombia*, 19-31.
- Ward, J., Slezak, J., Blute, M., Bergstralh, E., & Zincke, H. (2005). Radical prostatectomy for clinically advanced (cT3) prostate cancer since the advent of prostate-specific antigen testing: 15-year outcome. *British Journal Urology*, 6, 751-756.
- Watson, J., Baker, T., Bell, P., Gann, A., Levine, M., & Losick, R. (1994). Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. *Cancer Research*(54), 1641-1644.
- Wingo, P., Landis, S., & Ries, L. (1997). An adjustment to the 1997 estimate for new prostate cancer cases. *Cancer Journal Clinical*(47), 239-242.
- Zeegers, M., Kiemeny, L., Nieder, A., & Ostrer, H. (2004). How strong is the association between CAG and GGN repeat length polymorphisms in the androgen receptor gene and prostate cancer risk? *Cancer Epidemiology and Biomarkers*, 1(13), 1765-177.
- Zhu, M. L., & Kyprianou, N. (2008). Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer*(15), 841-849.
- Zhuang, Z., Merino, M., Chuaqui, R., Liotta, L. A., & Emmert-Buck, M. (1995). Identical allelic loss on chromosome 11q13 in microdissected in situ and invasive human breast cancer. *Cancer Research*, 467–471.

AREA	CASOS		MUERTES	
	n	EE ¹	n	EE ¹
África	39 600	17.5	28 000	12.5
Africa Oriental	9 100	14.5	7300	11.7
Africa Media	4 200	16.4	3400	13.4
Africa del Norte	5 200	8.1	4000	6.2
Africa del Sur	7 800	53.9	2600	19.3
África Occidental	13 300	22.2	10 700	18.3
Asia	133 200	7.2	59 700	3.1
Asia Oriental	82 700	8.2	26 800	2.5

ANEXOS

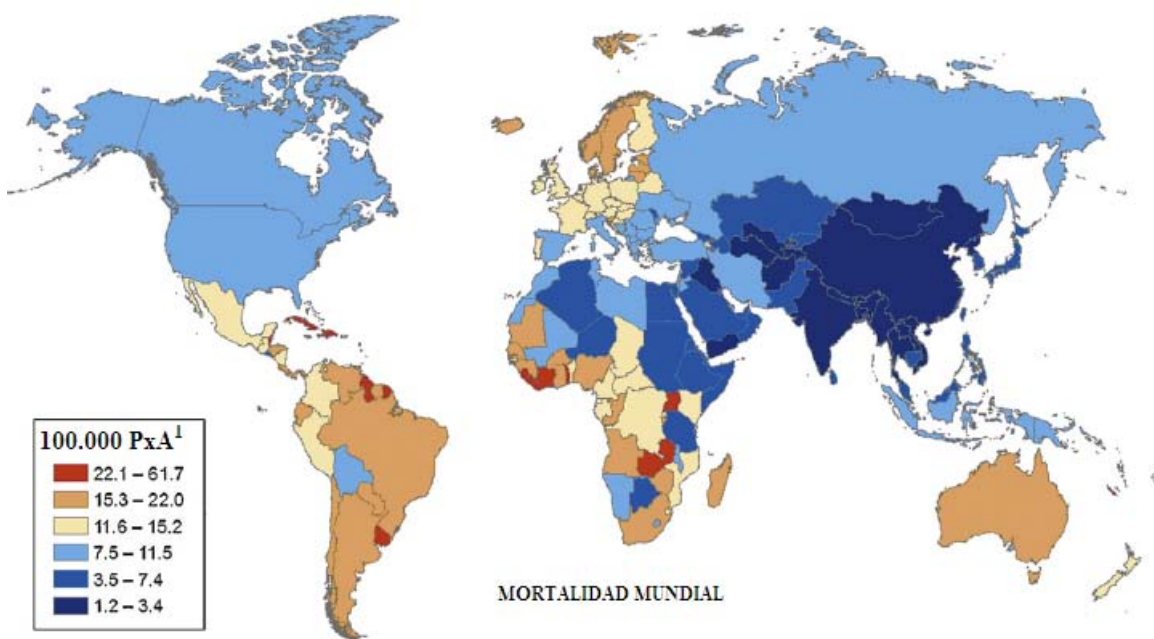
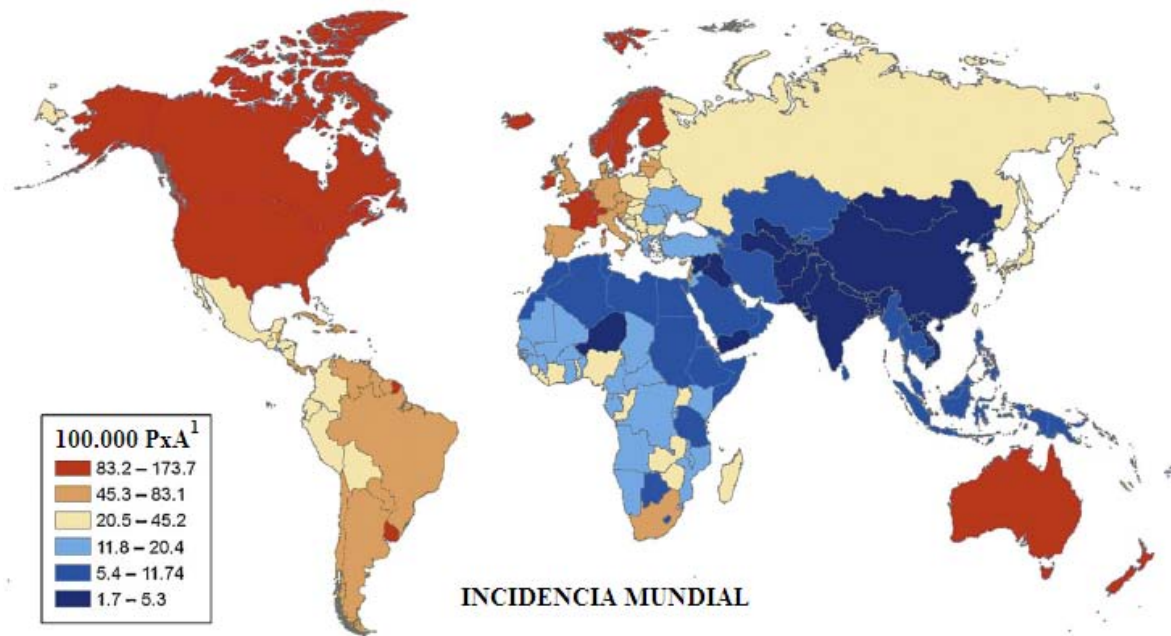
Anexo 1. Número estimado de nuevos casos y muertes por cáncer de próstata a nivel mundial.

Asia Meridional y Central	23 400	4.1	16 700	2.8
Asia del Sur	17 700	8.3	11 000	5.1
Asia Occidental	9400	13.8	5200	7.5
América	334 300	66.7	76 500	12.9
Caribe	16 000	71.1	6500	26.3
América Central	20 500	34.8	8100	12.6
América del Sur	84 100	50.2	29 300	16.2
América del Norte	213 700	85.6	32 600	9.9
Europa	370 700	59.3	89 600	12.0
Europa central y oriental	58 400	29.1	23 100	10.9
Norte de Europa	64 900	73.1	17 400	15.4
Europa del Sur	79 500	50.0	20 400	10.4
Europa Occidental	167 900	93.1	28 700	12.4
Oceanía	21 400	94.5	4300	15.3
Australia /Nueva Zelanda	21 000	104.2	4000	15.4
Melonesia	300	15.8	200	12.4
Micronesia/Polinesia	160	39.9	50	13.0
Mundial	899 100	27.9	258 100	7.4

Fuente: (GLOBOCAN, 2008)

¹ valores de Edad ajustada, tasa estandarizada por 100.000

Anexo 2. Variación internacional: Tasas de incidencia y mortalidad de cáncer de próstata en edades ajustadas



Fuente: (GLOBOCAN, 2008)

¹ P x A, valores de Edad ajustada, tasa estandarizada por 100.000 personas año

Anexo 3. Clasificación TNM (Tumor Nodulo Metástasis) del cáncer prostático, 7^{ma} Edición (Sobin, Gospodarowicz, & Wittekind, 2009).

T Tumor Primario

Tx	No se puede evaluar el tumor primario
T0	No hay evidencia del tumor primario
T1	Tumor no evidente clínicamente, no palpable ni visible mediante imágenes
T1a	Tumor detectado como hallazgo fortuito en una extensión menor o igual al 5% del tejido resecado.
T1b	Tumor detectado como hallazgo fortuito en una extensión mayor del 5% del tejido resecado.
T1c	Tumor identificado por punción biopsia / niveles del antígeno prostático específico elevados.
T2	Tumor limitado a la próstata ¹
T2a	El tumor abarca la mitad de un lóbulo o menos
T2b	El tumor abarca más de la mitad de un lóbulo, pero no ambos lóbulos
T2c	El tumor abarca ambos lóbulos.
T3	Tumor que se extiende a través de la cápsula prostática ²
T3a	Extensión extracapsular (unilateral o bilateral) incluyendo la participación microscópica del cuello vesical
T3b	Tumor invade la/s vesícula/s seminal/s.
T4	Tumor fijo o que invade estructuras adyacentes distintas de las vesículas seminales: esfínter externo, recto, músculos elevadores del ano y/o pared pélvica.

N Ganglios linfáticos regionales³

Nx	No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales.
N0	No se demuestran metástasis ganglionares regionales
N1	Metástasis ganglios linfáticos regionales.

M Metástasis a distancia⁴

Mx	No se pueden evaluar las metástasis a distancia
M0	No hay metástasis a distancia
M1	Metástasis distantes
M1a	Ganglio/s linfático/s no regionales.
M1b	Hueso/s
M1c	Otra/s localización/es

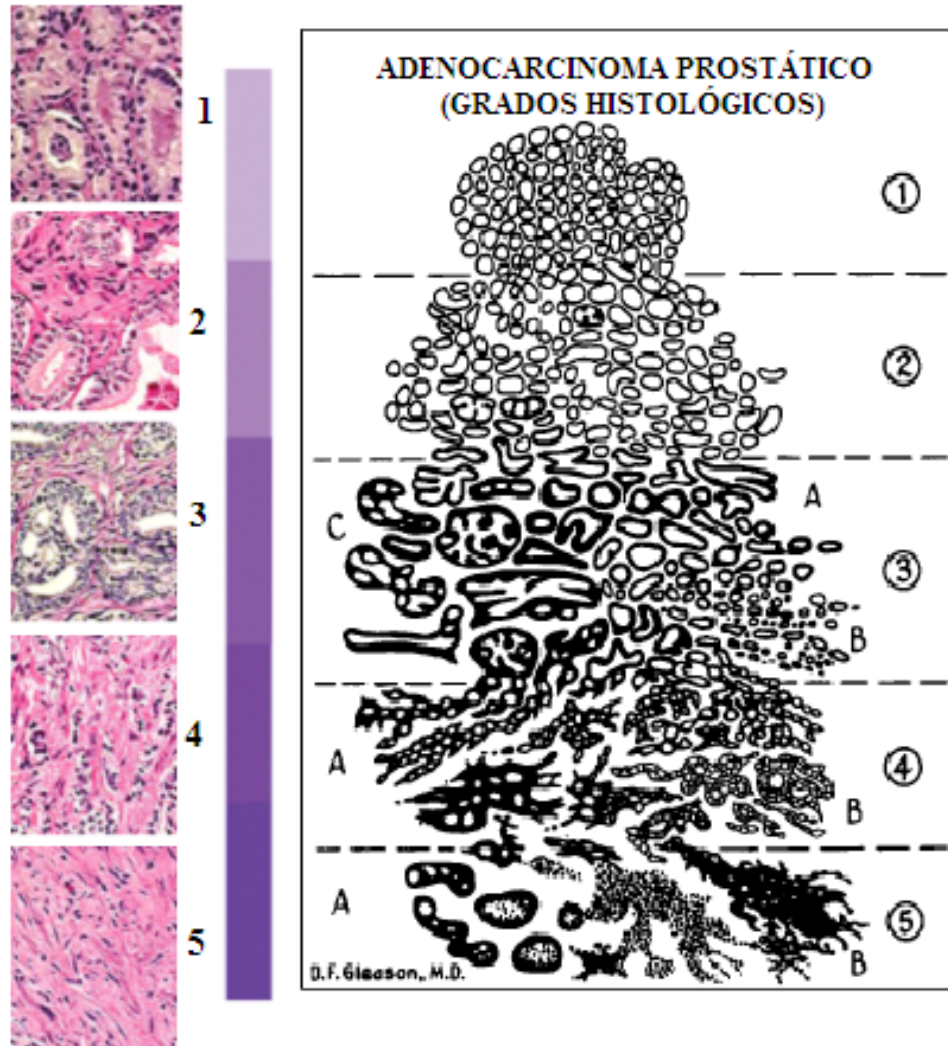
¹ Un tumor en uno o ambos lóbulos mediante biopsia con aguja, si no es palpable o visible mediante imágenes, se clasifica como T1c.

² Invasión al ápice prostático, o en la cápsula prostática (pero no más allá), no está clasificado como pT3, sino como pT2

³ Metástasis no mayores de 0,2 cm se puede designar pN1 mi.

⁴ Cuando la metástasis se presenta en más de un lugar, se debe utilizar la categoría más avanzada.

Anexo 4. Diagrama de la gradación histológica de Gleason



Esquema de D.F. Gleason, del artículo (Humphrey, 2004)

Sistema de graduación de Gleason:

Patrón 1 Glándulas únicas redondeadas, en masas redondeadas, con bordes bien definidos.

Patrón 2 Glándulas únicas redondeadas, algo separadas, con bordes menos definidos.

Patrón 3A Glándulas únicas de mediano tamaño con forma irregular y espacio irregular con bordes infiltrantes indefinidos.

Patrón 3B Muy similar a 3A, glándulas pequeñas a muy pequeñas que no forman cadenas.

Patrón 3C Epitelio papilar y cribiforme, rodeado de cilindros y masas; no necrosis.

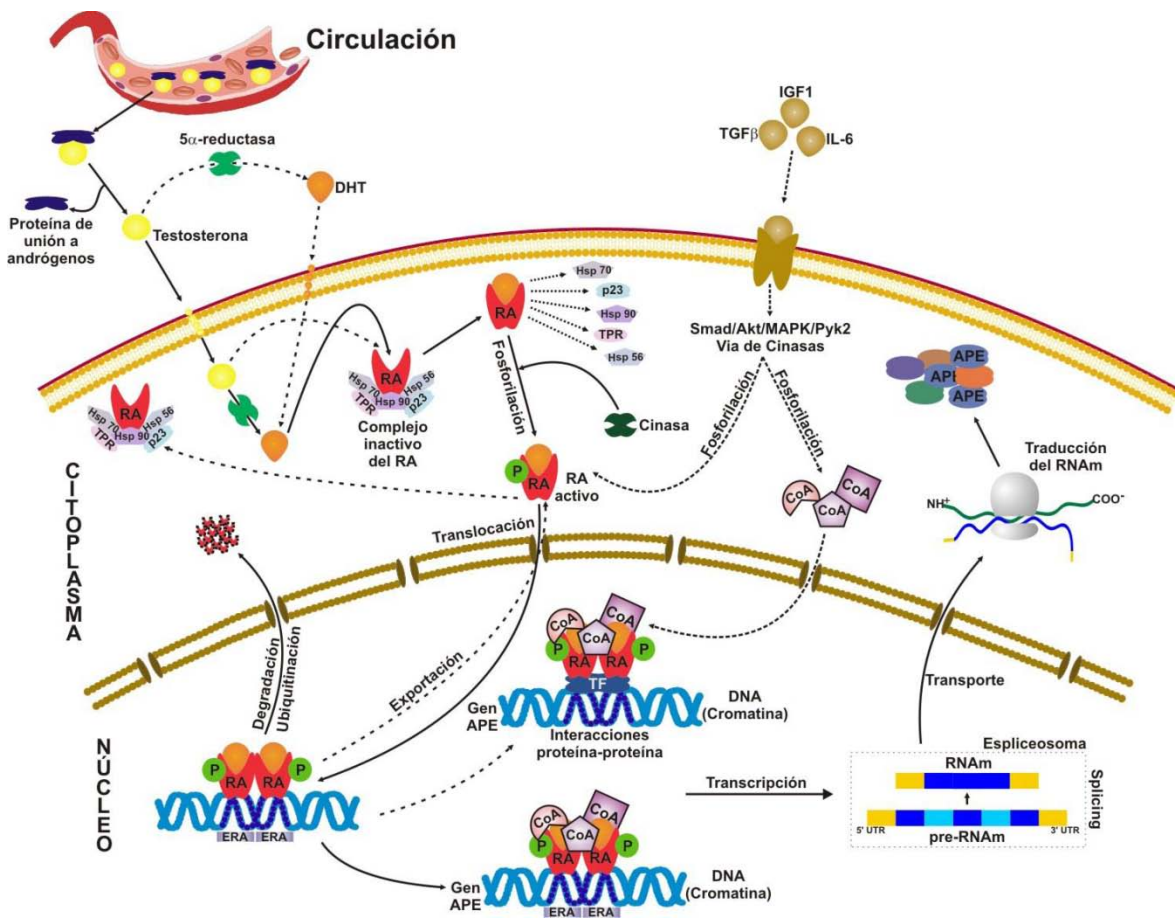
Patrón 4A Glándulas grandes, medianas o pequeñas en cordones, o masas infiltrantes.

Patrón 4B Similar a 4A, con células grandes claras, a veces se asemejan al "hipernefroma."

Patrón 5A No diferenciación glandular, con necrosis central.

Patrón 5B Adenocarcinoma anaplásico.

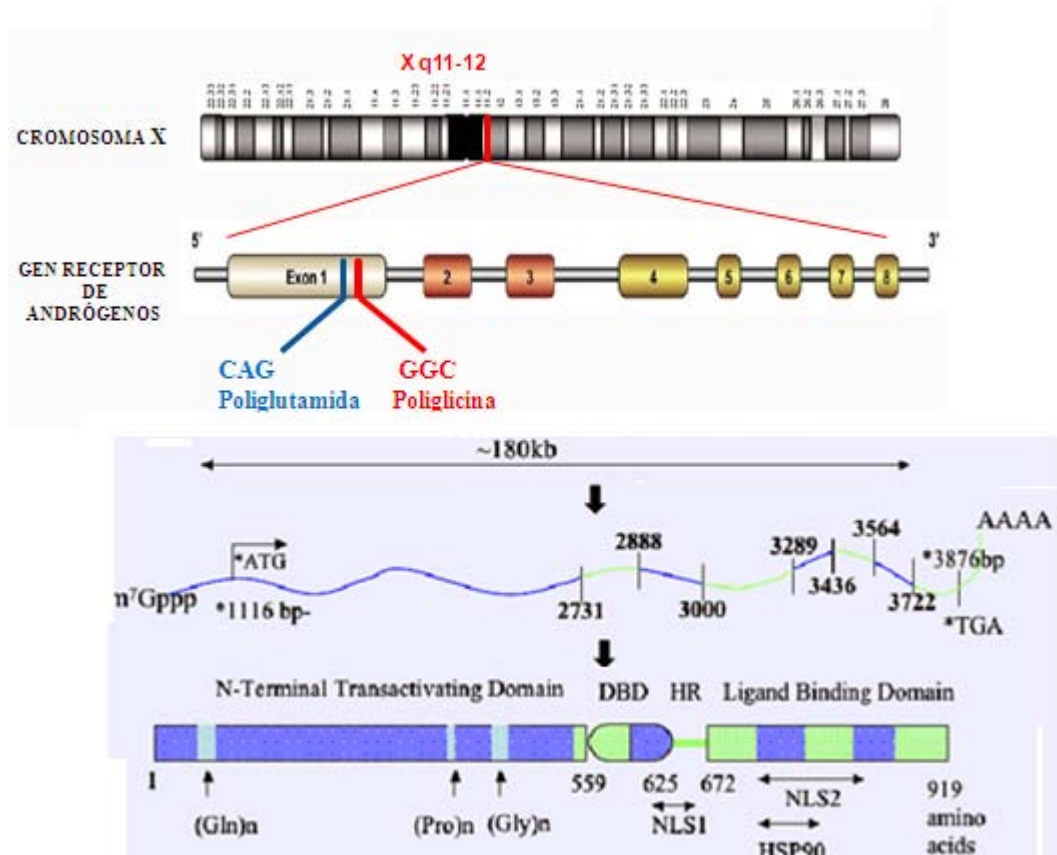
Anexo 5. Receptor Androgénico en una célula prostática.



Fuente: (Rojas, y otros, 2012) adaptado de (Heinlein & Chang, 2004)

El efecto de los andrógenos inicia con el transporte de la testosterona y metabolización a DHT, en el estroma, por la enzima 5α-reductasa y se transporta por difusión pasiva al citoplasma. En el citoplasma, monómeros inactivos del receptor androgénico están unidos a proteínas llamadas chaperonas (Hsp 90, Hsp 70, Hsp 56, p23, TPR), que “capturan” al receptor. Cuando la DHT se unen a este presenta un cambio conformacional, las proteínas chaperonas se disocian y el RA es fosforilado. Ya en el núcleo, forma dímeros y se une al DNA, posteriormente se acoplan CoA o TF que ayudan a modular la transcripción del gen. El RA puede nuevamente disociarse del DNA y exportarse al citoplasma, un proceso regulado por fosforilación, donde es nuevamente “capturado” por el complejo de chaperonas.

Anexo 6. Localización cromosómica y representación esquemática de la estructura del gen receptor de andrógenos



Fuente: (atlasgeneticsoncology, 2012)

El gen receptor de andrógenos está situado en el brazo largo del cromosoma x , En la región 11.12 , se divide en 8 exones con una longitud de ~2730 pb. El primer exón contiene repeticiones polimórficas de los trinucleótidos CAG que codifican una secuencia poliglutamida y otra de poliglicina por el tracto GGC, separadas ambas por aproximadamente 1.1 kilo bases. El gen del receptor de andrógenos codifica para una proteína que contiene 919 aminoácidos de longitud y un peso molecular de 98 kilodaltons con tres dominios funcionales

Anexo 7.- Consentimiento Informado

A quien corresponda:

El instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de las Américas, agradece al Sr.....
....., CI.....

Por la donación de una muestra sanguínea, la misma que será sometida a extracción de ADN y será de aporte para el proyecto: **“Repetición Polimórfica CAG-GGC del Gen Receptor de Andrógenos en población ecuatoriana afecta de Cáncer Prostático”**. Investigación que se esta llevando a cabo a partir de febrero del 2008.

La participación en los análisis realizados serán de absoluta confidencialidad, y los resultados obtenidos serán publicados guardando la identidad de los individuos analizados.

Con la firma del presente documento el sujeto certifica que no recibe apoyo económico de ningún tipo por parte del proyecto, y que de ser considerado puede ser excluido del mismo.

Atentamente

Dr. César Paz-y-Mino

Paulo Robles Ruiz

.....

.....

.....

Autorización del voluntario

Anexo 8. Encuesta Biomédica.

HOJA DE DATOS

Código del Laboratorio :-----

Fecha :-----

Datos personales .-

Nombre:-----

Edad:-----Fecha de nacimiento:-----

Estado civil:-----Ocupación-----

Lugar de procedencia:-----

Lugar de residencia: -----

Teléfono:-----Dirección-----

Antecedentes personales.-

Fuma: Si-----No-----Unidades por día -----Tiempo-----

Hace cuanto tiempo dejo el tabaco:-----

Exposiciones:-----

Consumo de café:----- Tasas al día -----

Consumo alcohol: Si ----- Frecuencia , No :-----

Enfermedades relevantes a la glándula prostática:-----

Antecedentes Familiares:-----

Si----- No----- Parentesco

Origen Étnico:-----

Padre:-----

Madre:-----

TABLAS

Tabla 1. Síntesis descriptiva de los parámetros biomédicos en la población control.

INDIVIDUOS NO AFECTOS DE CÁNCER PROSTÁTICO	148
EDAD (años)	148
40 – 55	60 (40%)
56 – 69	35 (24%)
70 – 83	38 (26%)
84 - 98	15 (10%)
CONSUMO DE BEBIDAS ALCOHOLICAS OCASIONAL	148
NO	40 (27%)
	108 (73%)
CONSUMO DE CIGARRILLOS OCASIONAL	148
NO	59 (40%)
	89 (60%)
PSA	49 de 148
6 – 6,5	15(31%)
6,6 – 7	6(12%)
7,1 – 7,5	15(31%)
7,2 – 9,3	13(26%)

Tabla 2. Síntesis descriptiva de los parámetros clínicos – patológicos

INDIVIDUOS AFECTOS DE CÁNCER PROSTÁTICO	108
EDAD (años)	108
46 - 58	16 (15%)
59 - 70	42 (39%)
71 - 82	35 (32%)
83 - 93	15 (14%)
PUNTUACIÓN HISTOLÓGICA DE GLEASON	(87 de 108)
2 - 4	6 (6,89%)
5 - 6	40 (45,98%)
7	16 (18,39%)
8 - 10	25 (28,74%)
ESTADIO TUMORAL	(87 de 108)
pT 1	5 (5,75%)
pT 2	55 (63,22%)
pT 3	26 (29,88%)
pT 4	1 (1,15%)
MARGEN QUIRÚRGICO	69 de 108
Afectado	10 (14,49%)
Libre	59 (85,51%)
INVASIÓN A VESÍCULAS SEMINALES	27 de 108
Presente	7 (25,93%)
Ausente	20 (74,07%)
INVASIÓN PERINEURAL	73 de 108
Presente	20 (27,40%)
Ausente	53 (72,60%)
INVASIÓN LINFOVASCULAR	75 de 108
Presente	3 (4,0%)
Ausente	72 (96,0%)
METASTÁSIS	108
Presente	8 (7,41%)
Ausente	100 (92,59%)
PSA PREOPERATORIO (ng/ml)	94 de 108
0 - 4	8 (8,51%)
4,1 - 10	24 (25,53%)
10,1 -20	22 (23,40%)
>20	40 (42,55%)

Tabla 3. Síntesis descriptiva de las muestras de población indígena.

INDIVIDUOS PERTENECIENTES A POBLACIONES INDÍGENAS	78
EDAD (años)	
19 - 33	11 (14%)
34 - 48	25 (32%)
49 - 62	22 (28%)
63 - 77	20 (26%)
Grupo Étnico (Pueblos y Nacionalidades)	
Cañari	20 (26%)
Karaqui	13(17%)
Otavaló	12(15%)
Pasto	11(14%)
Quichua	10(13%)
Warango	12(15%)
Provincia de origen	
Imbabura	25(32%)
Bolívar	12(15%)
Cañar	20 (26%)
Carchi	11(14%)
Cotopaxi	6(8%)
Pichincha	4(5%)
Lengua materna	
Kichwa	62(79%)
Castellano	16(21%)

Tabla 4. Distribución y frecuencia de la repetición CAG respecto a los tres grupos de estudio.

No.CAG	CASOS		CONTROLES		INDÍGENAS	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
12	6	5,6	0	0	0	0
13	5	4,6	0	0	0	0
14	6	5,6	0	0	0	0
15	8	7,4	0	0	0	0
16	4	3,7	9	6,1	0	0
17	2	1,9	5	3,4	0	0
18	7	6,5	9	6,1	2	2,6
19	6	5,6	9	6,1	1	1,3
20	8	7,4	11	7,4	2	2,6
21	17	15,7	12	8,1	3	3,8
22	13	12,0	38	25,7	9	11,5
23	7	6,5	14	9,5	8	10,3
24	3	2,8	6	4,1	19	24,4
25	3	2,8	19	12,8	7	9,0
26	4	3,7	2	1,4	19	24,4
27	3	2,8	3	2,0	2	2,6
28	1	0,9	5	3,4	2	2,6
29	2	1,9	3	2,0	4	5,1
30	3	2,8	3	2,0	0	0
TOTAL	108	100%	148	100%	78	100%

No.CAG, número de repeticiones CAG; n, frecuencia.

Tabla 5. Distribución y frecuencia de la repetición GGC respecto a los tres grupos de estudio.

No.GGC	CASOS		CONTROLES		INDÍGENAS	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
13	2	1,9	0	0	0	0
14	3	2,8	0	0	3	3,8
15	10	9,3	14	10,4	2	2,6
16	27	25,0	24	17,8	15	19,2
17	60	55,6	80	59,3	39	50,0
18	6	5,6	17	12,6	19	24,4
TOTAL	108	100%	135	100%	78	100%

No.GGC, número de repeticiones GGC; n, frecuencia.

Tabla 6. Asociación estadística entre los distintos parámetros clínico-patológicos.

	Gradación de Gleason (Cualitativa)	Estadio Tumoral
Estadio Tumoral ^a (Cualitativa)	$\chi^2 = 28,58$ $p=0.000$ $p < .001$	—
Margen Quirúrgico (Cualitativa dicotómica)	χ^2 Yates = 0,28 $p=0,597$ $p >0 .05$	χ^2 Yates = 0,34 $p=0,56$ $p >0 .05$
Invasión a Vesículas Seminales (Cualitativa dicotómica)	Fisher. T 0,046 yates 0,079 $p >0 .05$	Fisher. T 0,015 $p < 0 .05$
Metástasis (Cualitativa dicotómica)	Fisher. T 1,00 $p >0 .05$	Fisher. T 0,29 $p >0 .05$
PSA preoperatorio (Cuantitativa)	$\chi^2 = 15,50$ $p=0,000$ $p < .001$	$\chi^2 = 6,88$ $p=0,009$ $p < 0.01$

Fisher. T, prueba exacta de Fisher

^aEl estadio tumoral pTNM esta detallado en el anexo 3

Tabla 7 Asociación de riesgo de los decrecimientos CAG entre casos de cáncer de prostático y muestras control.

	Repetición CAG ^a							
	≥ 26	≤25	≤23	≤22	≤21	≤20	≤18	≤16
Casos CaP^b	13	6	7	13	17	14	9	29
Controles	16	25	14	38	12	20	14	9
OR		0,89	1,79	1,86	2,99	2,27	2,95	5,67
IC 95%	1	(0,41 - 1,93)	(0,97-3,31)	(1,07-3,24)	(1,79 - 5,01)	(1,35-3,81)	(1,63 - 5,35)	(2,56 - 12,58)
X^{2c d e}		0,93 ^{NS}	3,56 ^{NS}	4,94 [*]	17,86 ^{**}	9,75 ^{**}	13,28 ^{**}	21,31 ^{**}
p		0,76	0,059	0,026	< 0,001	0,002	< 0,001	< 0,001

El análisis en cada categoría se realizó de forma acumulativa y no por separado, es decir, las frecuencias a partir de las 16 repeticiones se suman a la categoría siguiente.

^a Repetición CAG subdividido en 8 categorías, a razón de analizar su decrecimiento y el riesgo de Cáncer prostático.

^b Casos de cáncer de Prostático (CaP)

^c Prueba de Chi-cuadrado (χ^2) * estadísticamente significativo con 1 grado de libertad (gl)

^d Prueba de Chi-cuadrado (χ^2) ** altamente significativo con 1 grado de libertad (gl)

^e Prueba de Chi-cuadrado (χ^2) ^{NS} no significativo con 1 grado de libertad (gl)

Tabla 8 Relación de riesgo de las repeticiones ≤ 21 CAG con cinco variables clínico patológicas, de las muestras de Adenocarcinoma prostático.

Variables Clínico Patológicas	Repeticiones CAG		Total	Odds Ratio (IC 95%)	X2
	>22	≤ 21			
Estadio Tumoral			87		
T1-T2b	19(21,84%)	20(23%)	39	4,75	8,88**
T2c-T4	8(9,19%)	40(45,97%)	48	(1,77-12,72)	p<0,005
Grado Gleason			87		
2--6	19(21,84%)	27(31%)	46	2,9	4,81*
7--10	8(9,19%)	33(37,9%)	41	(1,1-7,66)	p<0,05
PSA(ng/ml)			94		
<20	19(20,21%)	35(37,23%)	54	1,27	0,094 ^{NS}
≥ 20	12(12,76%)	28(29,79%)	40	(0,53-3,04)	p=0,76
Márgenes Quirúrgicos			69		
Ausente	20(28,98%)	39(36,52%)	59	1,19	0 ^{NS}
Presente	3(4,35%)	7(10,14%)	10	(0,28-5,13)	1
Invasión a Vesículas			27		
Ausente	4(14,8%)	16(59,3%)	20	1,5	Fisher. T ^{NS}
Presente	1(3,7%)	6(22,2%)	7	(0,14-16,27)	1

Fisher. T, prueba exacta de Fisher

Prueba de Chi-cuadrado (χ^2) * estadísticamente significativo con 1 grado de libertad (gl)

Prueba de Chi-cuadrado (χ^2) ** altamente significativo con 1 grado de libertad (gl)

Prueba de Chi-cuadrado (χ^2)^{NS} no significativo con 1 grado de libertad (gl)

Tabla 9 Relación de riesgo de la repetición GGC entre casos de cáncer de prostático y muestras control

	Repetición GGC^a			
	≥18	≤ 17	≤ 16	≤ 15
Casos CaP^b	6	60	27	15
Controles	17	80	24	14
OR		2,5	1,62	1,39
IC 95%	1	(0,93-6,45)	(0,95-2,78)	(0,64-3,03)
X²^c		3,47 ^{NS}	3,13 ^{NS}	0,71 ^{NS}
p		0,063	0,077	0,4

El análisis en cada categoría se realizó de forma acumulativa y no por separado, es decir las frecuencias a partir de las 15 repeticiones se anexan a la siguiente categoría.

^a Repetición GGC subdividido en 3 categorías a razón de analizar cada rango alélico y el riesgo de Cáncer de próstata.

^b Casos de cáncer de Prostático (CaP)

^c Prueba de Chi-cuadrado (χ^2)^{NS} no significativo con 1 grado de libertad (gl)

Tabla 10. Relación de riesgo de las repetición ≤ 16 GGC con cinco variables clínico patológicas, de las muestras de Adenocarcinoma prostático.

Variables Clínico Patológicas	Repeticiones GGC		Total	Odds Ratio (IC 95%)	X2
	≥ 17	≤ 16			
Estadio Tumoral			87		
T1-T2b	25(28,74%)	14(16,09%)	39	1,07	0,024 ^{NS}
T2c-T4	30(34,48%)	18(20,69%)	48	(0,45-2,58)	p=0,877
Grado Gleason			87		
2--6	27(31,03%)	19(21,84%)	46	0,66	0,86 ^{NS}
7--10	28(32,18%)	13(14,94%)	41	(0,27-1,59)	p= 0,35
PSA(ng/ml)			94		
<20	37(39,36%)	17(18,08%)	54	2,18	3,3 ^{NS}
≥ 20	20(21,28%)	20(21,28%)	40	(0,94-5,01)	p=0,069
Márgenes Quirúrgicos			69		
Ausente	38(55,07%)	21(30,43%)	59	0,78	0 ^{NS}
Presente	7(10,14%)	3(4,35%)	10	(0,18-3,32)	p=1
Invasión a Vesículas			27		
Ausente	13(48,1%)	7(25,9%)	20	0,31	Fisher. T ^{NS}
Presente	6(22,2%)	1(3,7%)	7	(0,03-3,11)	p=0,63

Fisher. T, prueba exacta de Fisher

Prueba de Chi-cuadrado (χ^2) * estadísticamente significativo con 1 grado de libertad (gl)

Prueba de Chi-cuadrado (χ^2) ** altamente significativo con 1 grado de libertad (gl)

Prueba de Chi-cuadrado (χ^2)^{NS} no significativo con 1 grado de libertad (gl)

Tabla 11. Relación de riesgo de las repeticiones ≤ 21 CAG + ≤ 16 GGC combinadas, entre casos de cáncer de prostático y muestras control

	Repeticiones CAG + GGC Combinadas	
	Individuos restantes	≤ 21CAG + ≤ 16GGC
Casos CaP^a	82(33,74)	26 (10,7%)
Controles	115(47,32)	20(8,23%)
OR	1,82	
IC 95%	(0,95 - 3,49)	
χ^2 d e	3,35 ^{NS}	
p	0,067	

^a Casos de cáncer de Prostático (CaP)

^b Prueba de Chi-cuadrado (χ^2)^{NS} no significativo con 1 grado de libertad (gl)

Tabla 12. Relación de riesgo de las repeticiones ≤ 21 CAG + ≤ 16 GGC combinadas, con cinco variables clínico patológicas, de las muestras de Adenocarcinoma prostático.

Variables Clínico Patológicas	Trinucleótidos combinados		Total	Odds Ratio (IC 95%)	X2
	Individuos restantes	≤ 21 CAG + ≤ 16 GGC			
Estadio Tumoral			87		
T1-T2b	30(34,5%)	9(10,3%)	39	1,51	0,72 ^{NS}
T2c-T4	33(37,9%)	15(17,2%)	48	(0,58 - 3,99)	p=0,4
Grado Gleason			87		
2--6	34(39,1%)	12(13,8%)	46	1,17	0,11 ^{NS}
7--10	29(33,3%)	12(13,8%)	41	(0,46-3.0)	p= 0,74
PSA(ng/ml)			94		
<20	39(41,5%)	15(16%)	54	0,75	0,34 ^{NS}
≥ 20	31(33%)	9(9,6%)	40	(0,29-1,95)	p=0,56
Márgenes Quirúrgicos			69		
Ausente	44(63,8%)	15(21,7%)	59	0,73	0 ^{NS}
Presente	8(11,6%)	2(2,9%)	10	(0,14-3,84)	p=1
Invasión a Vesículas			27		
Ausente	15(56,6%)	5(18,5%)	20	0,5	Fisher T
Presente	6(22,2%)	1(3,7%)	7	(0,05-5,22)	p=1 ^{NS}

Fisher. T, prueba exacta de Fisher

Prueba de Chi-cuadrado (χ^2)^{NS} no significativo con 1 grado de libertad (gl)

Tabla 13. Relación de riesgo de las repeticiones ≤ 21 CAG + ≥ 17 GGC combinadas, entre casos de cáncer de prostático y muestras control

	Repeticiones CAG + GGC Combinadas	
	Individuos restantes	≤ 21CAG + ≥ 17GGC
Casos CaP^a	65(26,7%)	43(17,7%)
Controles	106(43,6%)	29(11,9%)
OR	2,42	
IC 95%	(1,38 - 4,25)	
X^{2c d e}	9,67**	
p	0,002	

^a Casos de cáncer de Prostático (CaP)

^d Prueba de Chi-cuadrado (χ^2) ** altamente significativo con 1 grado de libertad (gl)

Tabla 14. Relación de riesgo de las repeticiones $\leq 21\text{CAG} + \geq 17\text{GGC}$ combinadas, con cinco variables clínico patológicas, de las muestras de Adenocarcinoma prostático.

Variables Clínico Patológicas	Trinucleótidos combinados		Total	Odds Ratio (IC 95%)	X2
	Individuos restantes	$\leq 21\text{CAG} + \geq 17\text{GGC}$			
Estadio Tumoral			87		
T1-T2b	28(32,2%)	11(12,6%)	39	2,77	5,06*
T2c-T4	23(26,4%)	25(28,7%)	48	(1,13 - 6,79)	p<0,05
Grado Gleason			87		
2--6	31(35,6%)	15(17,2%)	46	2,17	3,09 ^{NS}
7--10	20(23%)	21(24,1%)	41	(0,91 - 5,17)	p= 0,079
PSA(ng/ml)			94		
<20	34(36,2%)	20(21,3%)	54	1,54	1 ^{NS}
≥ 20	21(22,3%)	19(20,2%)	40	(0,67 - 3,53)	p=0,31
Márgenes Quirúrgicos			69		
Ausente	35(50,7%)	24(34,8%)	59	1,46	0,3 ^{NS}
Presente	5(7,2%)	5(7,2%)	10	(0,38 - 5,59)	p=0,58
Invasión a Vesículas			27		
Ausente	8(29,6%)	12(44,4%)	20	1,67	Fisher. T
Presente	2(7,4%)	5(18,5%)	7	(0,26 – 10,79)	0,68 ^{NS}

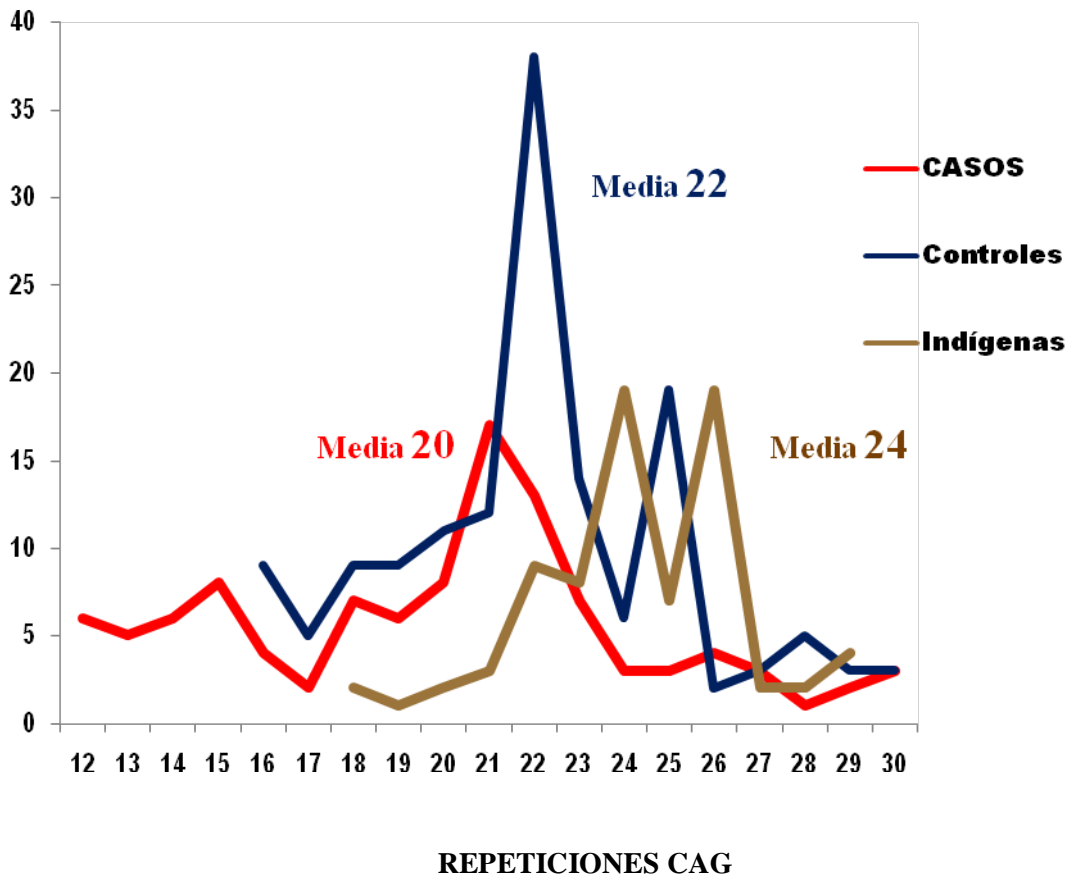
Fisher. T, prueba exacta de Fisher

Prueba de Chi-cuadrado (χ^2) * estadísticamente significativo con 1 grado de libertad (gl)

Prueba de Chi-cuadrado (χ^2)^{NS} no significativo con 1 grado de libertad (gl)

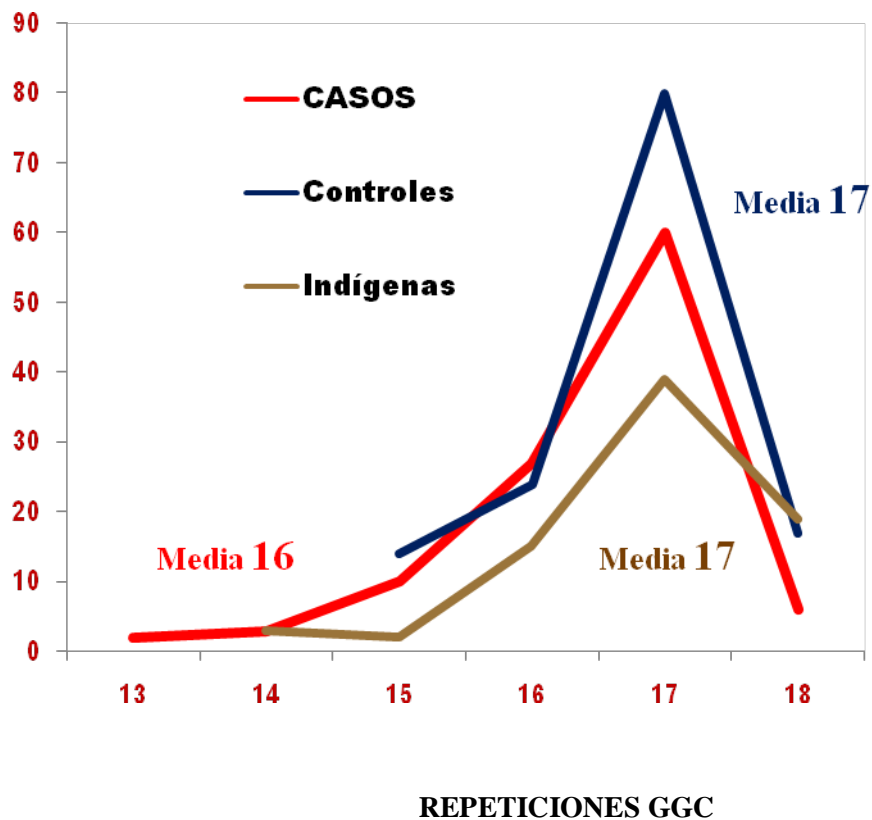
GRÁFICOS

Gráfico 1. Distribución y frecuencia de la repetición CAG en los tres grupos de estudio



En el grupo de Adenocarcinoma prostático se determinó una longitud de 12 hasta 30 repeticiones y un promedio de 20 CAG, los alelos de mayor frecuencia corresponden a 21 CAG (15,7%) y 22 CAG (12%). El grupo control presentó un tamaño de 16 hasta 30 repeticiones CAG, promedio de 22, los alelos de mayor frecuencia: 22 CAG (25,7%), 23 CAG (9,5%) y 25 CAG (12,8%). Las muestras de población indígena el tamaño de repetición se extiende desde 18 hasta 29 CAG, determinándose el promedio de repetición más alto de los tres grupos correspondiente a 24 CAG, los alelos de mayor frecuencia : 24 CAG y 26 CAG ambas con el 24,4%. Mediante la prueba de Chi-cuadrado (X^2) se determinaron diferencias altamente significativas en cuanto a la distribución de la repetición CAG en los tres grupos de estudio ($p < 0,001$). (Tabla5)

Gráfico 2. Distribución y frecuencia de la repetición GGC en los tres grupos de estudio



La distribución de las frecuencias de la repetición GGC se detalla en la tabla 5. En las muestras de Adenocarcinomas prostáticos el tamaño de la repetición GGC fue de 13 a 18 GGC con un promedio de 16, los alelos de mayor frecuencia fueron aquellos con un tamaño de 16(25%) y 17(55,6%) repeticiones. El grupo control presentó un tamaño entre 15 y 18 repeticiones GGC y un promedio de 17, siendo los tamaños de 16 y 17 GGC los mas frecuentes con un porcentaje del 17,8% y 59,3% respectivamente. Las muestras de la población indígena presentaron un tamaño de 14 hasta 18 repeticiones GGC con un promedio de 17, los alelos de mayor frecuencia fueron 17 GGC (50%) y 18 GGC (24,4%). Para poder determinar si existían diferencias entre las frecuencias de la repetición GGC de estos tres grupos de estudio, se realizó la prueba del Chi-cuadrado(X^2), encontrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$).